REGULATION DES ENERGIESTOFFWECHSELS VON RUMINOCOCCUS ALBUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

FRANZ JOSEF TEWES

aus Borchen/Kr. Paderborn

Marburg/Lahn 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

REGULATION DES ENERGIESTOFFWECHSELS VON RUMINOCOCCUS ALBUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

FRANZ JOSEF TEWES

aus Borchen/Kr. Paderborn

Marburg/Lahn 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 1976 bis Dezember 1978 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R.K. Thauer durchgeführt.

Teile der Arbeit wurden vorgetragen auf dem "XII International Congress of Microbiology" vom 3.bis 8. September 1978 in München.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Biologie der Phillips-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am: 13.7.1979
Tag der mündlichen Prüfung: 2o.7.1979

Berichterstatter: Prof.Dr. R.Thauer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	4
MATERIAL UND METHODEN	7
1. Verwendetes Material	7
2. Wachstum von *Ruminococcus albus*	9
1. Stammhaltung und Züchtung	9
2. Bestimmung des Wachstums	14
3. Analyse von Fermentations-Substraten und -Produkten	15
3. Aktivitätsbestimmung von Enzymen	21
1. Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	22
2. Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	23
3. NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase	25
4. Ferredoxin-Hydrogenase	26
5. Acetaldehyd-Dehydrogenase	28
6. Alkohol-Dehydrogenase	29
7. Phosphoglycerat-Kinase	30
8. Phosphotransacetylase	32
9. Acetat-Kinase	33
4. Isolierung und Analyse von Ferredoxin	34
1. Isolierung von Ferredoxin	34
2. Bestimmung von Eisen	38
3. Bestimmung von säurelabilem Schwefel	40
4. Bestimmung des Molekulargewichtes	43
5. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	45
6. Bestimmung des Redoxpotentials E^{o}	46

ERGEBNISSE 49

1. Regulation der Glucosefermentation durch den H_2-Partialdruck 49

1. Fermentation von Glucose bei pH_2 = 0.5 atm 50

1. Fermentationsbilanz 50

2. An der Produktbildung beteiligte Enzyme 53

2. An der Regulation beteiligte katabole Schlüsselenzyme 61

1. NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase 62

2. Acetyl-CoA umsetzende Enzyme 63

3. Ferredoxin-Hydrogenase 66

2. Charakterisierung von Ferredoxin 68

1. Reinigung von Ferredoxin 68

2. Molekulargewicht 71

3. Aminosäurezusammensetzung 72

4. Molarer Extinktionskoeffizient ε_{390} 74

5. Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel 76

6. Redoxpotential E^o 77

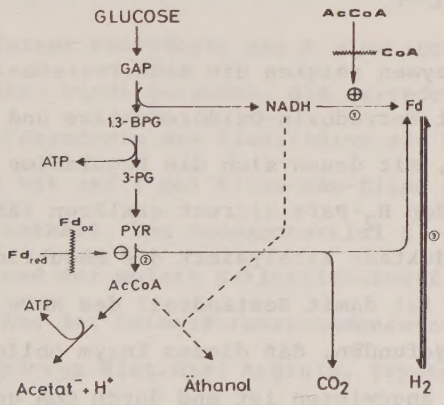
DISKUSSION 79

LITERATURVERZEICHNIS 87

ZUSAMMENFASSUNG

Ruminococcus albus fermentiert Glucose zu Acetat, Äthanol, CO_2 und H_2. Die relativen Mengen der gebildeten Produkte hängen dabei stark vom H_2-Partialdruck ab: bei niedrigem pH_2 werden mehr H_2 und Acetat und damit weniger Äthanol gebildet als bei hohem pH_2. Die Produktbildung wird also durch den H_2-Partialdruck reguliert. Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, den Mechanismus der Regulation aufzuklären. Dazu wurde zunächst der Fermentationsweg untersucht und anschließend die Regeleigenschaften kataboler Schlüsselenzyme analysiert. Es wurde gefunden:

Glucose wird in *R. albus* über die im folgenden Schema aufgeführten Reaktionen fermentiert:



Das Schema basiert auf Fermentationsbilanzen, Wachstumsertragsmessungen und dem Nachweis der wichtigsten beteiligten Enzyme und Elektronenüberträger. Glucose wird unter Beteiligung von Reaktionen des Embden-Meyerhof-Weges und der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktasereaktion zunächst zu 2 Acetyl-CoA und 2 CO_2 oxidiert. Dabei werden pro mol Glucose 2 mol ATP bei der Oxidation von Glycerinaldehydphosphat (GAP) zu 3-Phosphoglycerat (3-PG)

gebildet. Das in der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Reaktion gebildete NADH wird entweder durch Reduktion von Ferredoxin (Fd) oder von Acetyl-CoA reoxidiert. Im ersteren Fall wird Acetyl-CoA unter Bildung von ATP zu Acetat umgesetzt, im letzteren ohne ATP-Bildung zu Äthanol reduziert. Die Fermentation von *R. albus* ist also ein verzweigter Energiestoffwechsel, in dem NADH und Acetyl-CoA Ausgangspunkte von Verzweigungen sind, die stöchiometrisch miteinander gekoppelt sind und in denen entschieden wird, welche Produkte und damit wieviel ATP gebildet wird: wird NADH ausschließlich durch Ferredoxin reoxidiert, so wird Glucose zu 2 Acetat, 2 CO_2 und 4 H_2 unter Bildung von 4 ATP fermentiert; wird dagegen NADH durch Reduktion von Acetyl-CoA zu Äthanol reoxidiert, so wird Glucose zu 1 Acetat, 1 Äthanol, 2 CO_2 und 2 H_2 unter Bildung von nur 3 ATP umgesetzt.

Von den untersuchten Enzymen zeigten die NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase, die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und die Hydrogenase Eigenschaften, mit denen sich die Regulation des Energiestoffwechsels durch den H_2-Partialdruck erklären läßt. Die NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert die Reduktion von Ferredoxin mit NADH und ist damit Bestandteil des NADH-Verzweigungspunktes. Es wurde gefunden, daß dieses Enzym obligat auf Acetyl-CoA als Effektor angewiesen ist und durch CoA gehemmt wird. Die Oxidation von NADH mit Ferredoxin steht damit in der Zelle unter der Kontrolle des Acetyl-CoA/CoA-Quotienten. Die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO_2. Es zeigte sich, daß dieses Enzym durch reduziertes Ferredoxin (Fd_{red}) stark gehemmt wurde, wobei das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Ferredoxin und nicht die absolute Konzentration von reduziertem Ferredoxin

für die Aktivität ausschlaggebend ist. Die Bildung von Acetyl-CoA und damit die Konzentration des Thioesters in der Zelle steht damit unter der Kontrolle des Fd_{red}/Fd_{ox}-Paares. Die Hydrogenase katalysiert die reversible Reduktion von H^+ mit Ferredoxin zu H_2. Es wurde durch CO-Hemmversuche nachgewiesen, daß die Hydrogenasereaktion nahe am oder im Gleichgewicht operiert. Da das Redoxpotential von Ruminococcus-Ferredoxin (s.u.) praktisch identisch ist mit dem des H^+/H_2-Paares, sollte sich in der Zelle der H_2-Partialdruck in dem Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten wiederspiegeln. Es läßt sich daher voraussagen, daß über die Hydrogenase-Reaktion und die Pyruvat:Fd-Oxidoreduktasereaktion die NADH:Fd-Oxidoreduktase durch den H_2-Partialdruck beeinflußt wird, und zwar so, daß bei hohem pH_2 das Enzyme inaktiv ist und bei niedrigem pH_2 aktiv.

Es wurde ferner Ferredoxin aus *R. albus* isoliert und charakterisiert. Dabei wurde gefunden, daß Ferredoxin aus *R. albus* ähnlich wie Ferredoxin aus Clostridien ein Molekulargewicht von etwa 6000 hat und 8 mol Nicht-Häm-Eisen und 8 mol säurelabilen Schwefel enthält. Das Redoxpotential E^o wurde zu -422 mV bestimmt und der molare Extinktionskoeffizient zu ε_{390} = 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$. Aus der Aminosäurenzusammensetzung geht hervor, daß die Aminosäuren Histidin, Arginin, Tryptophan, Phenylalanin und Methionin fehlen. Dafür enthält das Ferredoxin jedoch 2 mol Leucin, eine Aminosäure, die in allen bisher untersuchten 8Fe/8S-Ferredoxinen zu fehlen scheint.

EINLEITUNG

Cellulose wird in anaeroben Bereichen der Erde durch Bakterien letztlich umgesetzt zu CO_2 und CH_4, so in Sedimenten von Gewässern, in Sümpfen, in tieferen Schichten des Erdreichs, im Faulturm von Kläranlagen und - mit Einschränkungen - auch im Pansen von Wiederkäuern (41, 79, 82, 83).

$$(Glc)_n \longrightarrow 3n\ CH_4 + 3n\ CO_2 \qquad \Delta G^{O'} = -415n\ kJ\ mol^{-1}$$

Die Methangärung ist im Kohlenstoffkreislauf ein quantitativ wichtiger Prozess, in dem bis zu 5 % des in der Photosynthese jährlich gebildeten organischen Materials wieder abgebaut werden (19). Die Methangärung ist eine Stoffwechselleistung einer syntrophen Assoziation von H_2-bildenden Bakterien und methanogenen Bakterien (12, 24, 80). Die erste Gruppe fermen-

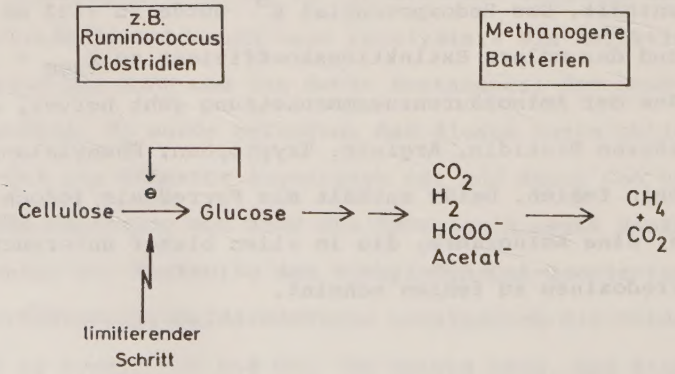
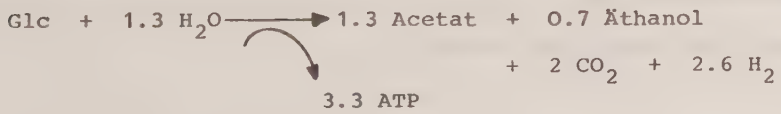


Abb. 1: Schema der Methangärung in anaeroben Bereichen der Erde

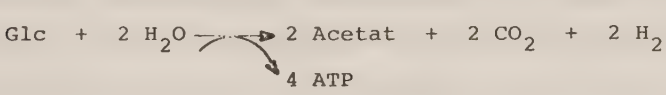
tiert Cellulose über Glucose zu 2 Acetat, 2 CO_2 und 4 H_2, die zweite Gruppe wächst dann auf den Produkten der ersten unter Bildung von CO_2 und Methan (Abb. 1).

Die Umsetzung von Cellulose zu Acetat, CO_2 und H_2 ist in der Methangärung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, was daraus hervorgeht, daß sich grundsätzlich weder Acetat noch H_2 in nennenswerten Konzentrationen als Zwischenprodukte anhäufen: in den oben aufgeführten Biotopen findet man H_2-Konzentrationen von weniger als 10^{-6} M, was einem H_2-Partialdruck von etwa 10^{-3} atm entspricht (25). Die methanogenen Bakterien sind in der Natur auf die Stoffwechselaktivität der H_2-bildenden Bakterien angewiesen, da sie ausschließlich Substrate wie CO_2 + H_2, Formiat oder Acetat fermentieren können (41). Aber auch die H_2-bildenden Bakterien gewinnen durch das Zusammenleben mit den methanogenen Bakterien einen Vorteil. Das soll hier am Beispiel von *Ruminococcus albus* erklärt werden, wurde jedoch auch für *Clostridium cellobioparum* (14), *Clostridium thermocellum* (76), *Ruminococcus flavefaciens* (37) und *Selenomonas ruminantium* (13, 55) experimentell nachgewiesen.

Ruminococcus albus ist ein strikt anaerobes , gram positives Pansenbakterium, das in Reinkultur Glucose fermentiert (26).



Dabei werden, wie in dieser Arbeit gezeigt wird, 3.3 mol ATP pro mol Glucose gebildet. Wird das Bakterium dagegen zusammen mit Organismen gezüchtet, die den H_2-Partialdruck niedrig halten (eine Situation wie sie im Pansen vorherrscht) so wird Glucose fermentiert zu



wobei 4 mol ATP gebildet werden. Die ATP-Ausbeute in der Fermentation wird also von 3.3 auf 4 erhöht, wenn *R. albus* mit H_2-verbrauchenden Bakterien zusammenlebt. Berücksichtigt man, daß in anaeroben Bakterien die ATP-Bildung das Wachstum limitiert, so bedeutet die beobachtete Steigerung in der ATP-Ausbeute einen erheblichen Vorteil für die betroffenen Bakterien.

In der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel von *Ruminococcus albus* untersucht werden, wie es zur Umstellung der Fermentation und damit zu einer Erhöhung der ATP-Ausbeute in diesen Bakterien bei verändertem H_2-Partialdruck kommt. Dazu wurde zunächst geklärt, auf welchem Weg unter Beteiligung welcher Reaktionen, Enzyme und Elektronenüberträger *R.albus* Glucose fermentiert. Anschließend wurde untersucht, welche Enzyme des Energiestoffwechsels reguliert werden und durch welche Effektoren eine Regulation erfolgt.

MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendetes Material

Bakterien: *Ruminococcus albus* Stamm 7 (ATCC 27210) war ein Geschenk von Terry L. Miller, Dep. of Health, Albany, USA. *Clostridium pasteurianum* (ATCC 6013, DSM 525) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen, bezogen.

Feinchemikalien: Trypticase® Pepton von Becton, Dickinson & Co, Cockeysville, USA. N,N'-Dimethyl-p-phenylendiamin-monohydrochlorid von Eastman Kodak, Rochester, USA. iso-Buttersäure z.S.; Dithioerythrit f. bioch. Zwecke; DL- Methyl-buttersäure z.S.; iso-Valeriansäure z.S. und n-Valeriansäure z.S. von Merck, Darmstadt. 2,2'-Azino-bis-(3-äthyl-benzthiazolin)-6-sulfonsäure x $(NH_4)_2$ z.A.; Bathophenanthrolin z.A.; Kalium-arsenat (KH_2AsO_4) z.A.; N-Morpholino-3-propansulfonsäure (MOPS) z.A. und Resazurin z.A. von Serva, Heidelberg.

Biochemikalien: Enzyme und Coenzyme von Boehringer, Mannheim. Ferredoxine aus *Clostridium pasteurianum* und *Spinacia oleracea* (Spinat) wurden freundlicherweise von Herrn P. Schönheit, Fachbereich Biologie, zur Verfügung gestellt.

Chromatographiereagenzien: Polymin P (M_r 20 000) von BASF, Ludwigshafen. Dowex® 50 W, 200 bis 400 mesh von Fluka, Buchs, CH. Molekularsieb 5 Å ø 0.3 bis 3 mm von Merck, Darmstadt. Sephadex® G-50 fine von Pharmacia, Uppsala, S. Aktivkohle Norit A, pract. ø 4 bis 5 µm und Dextranblau, rein, von Serva, Heidelberg. DEAE-Cellulose DE 52, microgranulär vorgequollen von Whatman, Maidstone, GB.

Gase: Kohlendioxid 99,995 %, Kohlenmonoxid 99,997 %, Stickstoff 99,996 % und Wasserstoff 99,993 % von Messer-Griesheim, Frankfurt. Kohlendioxid mit einem Sauerstoffanteil ≤ 25 vpm wurde an 340 °C heißen Kupferspänen nachgereinigt. Die Sauerstoffkonzentration in den übrigen Gasen betrug ≤ 5 vpm.

2. Wachstum von *Ruminococcus albus*

Ruminococcus albus ist ein gram positives, nichtsporenbildendes Bakterium. Es wächst auf Cellulose und Cellobiose - wenige Stämme auch auf Glucose - und bildet Acetat, Äthanol, CO_2 und H_2 als Hauptprodukte der Fermentation. Als eines der drei Hauptvertreter der cellulolytischen Bakterien im Pansen von Wiederkäuern erfüllt *R. albus* dort eine wichtige Funktion: Durch Hydrolyse von Cellulose zu löslichen Kohlenhydraten führt es den nichtcelluloseabbauenden Bakterien Substrate zu und ermöglicht somit deren Wachstum. Ebenso wird der anfallende Wasserstoff von den methanogenen Bakterien metabolisiert. Gegenüber Sauerstoff ist *R. albus* sehr empfindlich. Seine Kultivierung ist daher nur unter Einhaltung von strikt anaeroben Bedingungen möglich.

2.1. Stammhaltung und Züchtung

Stammhaltung und Züchtung von *R. albus* (glucoseverwertender Stamm 7) erfolgte bei 37 °C auf einem Glucose-Komplex-Medium (22, 45; modifiziert) folgender Zusammensetzung: 1.3. mmol K_2HPO_4; 1.8 mmol KH_2PO_4; 7.6 mmol $(NH_4)_2SO_4$; 8.2 mmol NaCl; 0.4 mmol $MgSO_4$ x 7 H_2O; 0.4 mmol $CaCl_2$ x 2 H_2O; 50 µmol $FeSO_4$ x 7 H_2O; 37.7 mmol Na_2CO_3; 2.8 mmol Cystein x HCl; 28 mmol Glucose x H_2O; 5 g Trypticase; 2 g Hefeextrakt; je 0.1 ml folgender Fettsäuren: iso-Buttersäure, DL-Methylbuttersäure, Valeriansäure, iso-Valeriansäure; 1 mg Resazurin; ad 1 l mit dest H_2O. Der pH-Wert wurde auf 6.7 durch Begasen mit CO_2 eingestellt. Die Zugabe der verzweigten Fettsäuren war für das

Wachstum essentiell und ersetzte den sonst zugesetzten Magensaft von Wiederkäuern (18). Resazurin als Redoxindikator ($E^{O'}$ = -52 mV; 73) diente zum Nachweis für anaerobe Bedingungen.

Zur Stammhaltung wurde *R. albus* in geschlossenen 10 ml-Serumgläschen (Fa. Zinsser, Frankfurt) auf 5 ml des oben beschriebenen Mediums nach der von Miller entwickelten "serum-bottle"-Methode kultiviert (46). Das Medium wurde wie folgt hergestellt und auf die Serumgläschen verteilt: 200 ml Medium (ohne Cystein, $FeSO_4$ und Na_2CO_3) wurde zum Entfernen von Sauerstoff kurz aufgekocht und anschließend unter einem Strom von O_2-freiem CO_2 im Eisbad auf Zimmertemperatur abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 0.8 g Na_2CO_3. Anschließend wurde die Lösung solange mit CO_2 durchgast, bis ein pH-Wert von ca. 6.8 erreicht wurde. Dabei wurden auch letzte Spuren von Sauerstoff aus dem Medium entfernt, was durch Verschwinden der violett-roten Farbe des Redoxindikators angezeigt wurde. Nach Zugabe und Lösen von 0.1 g Cystein x HCl und 2.8 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O wurden unter CO_2 als Schutzgas jeweils 5 ml des Mediums

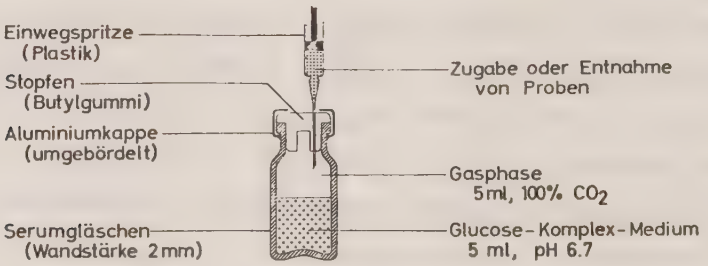


Abb. 2: "Serum-bottle"-Methode zur Anzucht von strikt anaerob wachsenden Mikroorganismen

in dickwandige 10 ml-Serumgläschen gefüllt, die mit Butylkautschukstopfen und Aluminiumkappe verschlossen wurden (Abb. 2). Die gefüllten Serumgläschen wurden 15 min bei 121 °C sterilisiert und anschließend bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Es wurde alle 24 Stunden überimpft. Hierzu wurden jeweils 0.1 ml einer 24 h alten Kultur mit einer Einwegspritze (Tuberkulinspritze Omnifit®; Fa. Braun, Melsungen) von Serumgläschen zu Serumgläschen überführt (Abb. 2). Kurz vor Zugabe des Inokulums (2 %) wurden, ebenfalls mit einer Einwegspritze, 0.15 ml Na_2S/Cystein-Stammlösung I (s.u.) hinzugefügt, um anaerobe Bedingungen sicherzustellen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Wärmeschrank. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden ca. 9 h alte Kulturen bei -25 °C eingefroren. Unter diesen Bedingungen blieben die Bakterien für mehrere Monate lebensfähig.

Für Wachstumsversuche wurde *R. albus* in 50 ml-Serumgläschen auf 30 ml Medium bzw. in 250 ml Steilbrustflaschen aus Duranglas (Fa. Schott, Mainz) auf 200 ml Medium gezogen, wobei Herstellung und Abfüllung des Mediums in gleicher Weise erfolgte wie zuvor beschrieben. Nur Eisensulfat wurde getrennt als Stammlösung erst nach Autoklavieren und Abkühlen zugegeben (50 µl einer 1 mM $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ in 0.05 N HCl je ml Medium).

Zur Züchtung von größeren Mengen Zellen wurde *R. albus* in einer 10 l-Steilbrustflasche aus Duranglas (Fa. Schott, Mainz) gezüchtet. Als Verschluß diente ein breiter Stopfen aus Butylkautschuk, der mit einer Spezialhalterung festgeklemmt wurde. Über drei Absperrventile mit Luer-Lock-Ansatz

(Fa. Volzer, Tuttlingen) im Stopfen konnte die Begasung, die Zugabe der Stammlösung und das Ablassen des Gasüberdruckes erfolgen. Bis auf Glucose, Eisen, Na_2CO_3 und Cystein (s.u.) wurden die übrigen Bestandteiledes Mediums in 9400 ml dest. H_2O im Fermenter gelöst und 1 h bei 121 °C mit dem lose aufgelegten Stopfen sterilisiert. Durch Zugabe von Siedesteinchen zum Medium und durch Sterilisieren unter strömendem Wasserdampf konnte gleichzeitig eine Anaerobisierung des Mediums erreicht werden. Nach Abkühlen des Fermenters im geschlossenen Autoklav für ca. 1 bis 1.5 h wurde bei Erreichen des Druckausgleichs der Autoklav vorsichtig geöffnet und der Fermenter bei noch leicht kochendem Medium sofort mit dem Stopfen fest verschlossen. Das Ausbleiben der roten Färbung durch Resorufin (1. Reduktionsstufe von Resazurin) zeigte Abwesenheit von Sauerstoff an. Nach Abkühlen auf 37 °C erfolgte die Zugabe der übrigen Substanzen zum Medium. Hierzu wurden zunächst über einen Schlauch aus Butylkautschuk (ø 6 mm, Wandstärke 1.5 mm) mit Luer-Ansatz und einer Kanüle (1,1 x 49 mm) hintereinander 10 ml Fettsäurelösung und 200 ml Na_2CO_3-Lösung mit Überdruck aus den Gefäßen in den Fermenter überführt. Anschließend wurde mit sterilem und O_2-freiem CO_2 über eine Filterkerze solange begast, bis ein pH von 6.8 erreicht wurde, danach wurden die restlichen Substanzen in gleicher Weise zugegeben: 50 ml Na_2S/Cystein-Lösung II, 200 ml Glucoselösung und 5 ml Eisenlösung. Erst jetzt wurde überimpft. Als Inokulum wurde eine 9 h alte gut gewachsene Vorkultur von 200 ml verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Nach etwa 2 Stunden wurde der entstehende Gasüberdruck kontinuierlich abgelassen. Bei Erreichen einer Zelldichte von $\Delta E \approx 4$

(nach etwa 8 bis 9 h) wurden die Zellen in einer Durchlaufzentrifuge (Fa. Westfalia-Separator, Oelde) abgeerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -25 °C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug 45 bis 50 g Feuchtzellen pro 10 l Medium.

Stammlösungen: Zur Herstellung der unten aufgeführten Lösungen wurden die Substanzen unter N_2 in O_2-freiem dest. H_2O gelöst und in die entsprechenden Serumgläschen bzw. 250 ml-Steilbrustflaschen aus Duranglas mit Stopfen und Drahtbügel überführt. Die Sterilisation erfolgte für 15 min bei 121 °C im Autoklaven.

Na_2S/Cystein-Lösung I: 1.25 g Cystein x HCl in 100 ml dest. H_2O, eingestellt mit festem KOH auf pH 10, Zugabe von 0.3 g Na_2S x 9 H_2O und Abfüllung zu je 5 ml in 10 ml-Serumgläschen;

Na_2S/Cystein-Lösung II: Herstellung wie unter Lösung I beschrieben, jedoch mit 5 g Cystein x HCl und 1.25 g Na_2S x 9 H_2O in 50 ml H_2O;

Eisen: 0.14 g $FeSO_4$ x 7 H_2O in 5 ml 0.1 N HCl;

Fettsäuren: je 1 ml von iso-Buttersäure, DL-Methylbuttersäure, Valeriansäure und iso-Valeriansäure wurden in 6 ml H_2O mit KOH neutralisiert;

Glucose: 55 g Glucose x H_2O in dest H_2O ad 200 ml.

Na_2CO_3: 40 g in dest H_2O ad 200 ml.

2.2. Bestimmung des Wachstums

Zur Bestimmung des Wachstums von *R. albus* wurde die Trübung als Maß herangezogen. Hierzu wurden 0.2 ml der Kultur mit H_2O 1 : 5 verdünnt und die Extinktion bei λ_{578} gegen H_2O als Leerwert photometrisch bestimmt (Zeiss Filterphotometer PL 4). Durch die Anwesenheit von Resazurin als Redoxindikator im Kulturmedium trat bei der Extinktionsbestimmung eine leichte Rotfärbung auf, die eine scheinbare Trübungszunahme bewirkte. Vor jeder Messung wurde daher die verdünnte Bakteriensuspension mit einigen Kristallen Natrium-Dithionit reduziert. Der Meßwert wurde auf die unverdünnte Kultur hochgerechnet.

2.3. Analyse von Fermentations-Substraten und -Produkten

Ruminococcus albus fermentiert Glucose zu Acetat, Äthanol, CO_2 und H_2. Substrat und Produkte wurden wie folgt bestimmt:

2.3.1. Bestimmung von Glucose

Glucose wurde enzymatisch mit Glucoseoxydase (GOD; EC 1.1.3.4.) und Peroxydase (POD; ED 1.11.1.7) bestimmt, wobei die Oxidation von 2.2'-Azino-bis-(3-äthyl-benzthiazolin)-6-sulfonsäure-$(NH_4)_2$ (=ABTS) mit H_2O_2 photometrisch verfolgt wurde (7).

$$\text{D-Glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{GOD}} H_2O_2 + \text{D-Gluconsäure}$$

$$H_2O_2 + 2\ \text{ABTS} \xrightarrow{\text{POD}} 2\ \text{ABTS}^{\cdot} + 2\ H_2O$$

ABTS als Chromogen besitzt einen 2-Elektronenübergang (77). Unter den unten angegebenen Bedingungen entsteht jedoch nur das Radikalkation als erste Oxidationsstufe (Abb.3). Dieses Radikalkation ist bemerkenswert stabil und durch seine intensive blaugrüne Farbe leicht bei λ_{420} photometrisch nachweisbar.

Der Test wurde in 3 ml-Glasküvetten (Schichttiefe d= 1 cm) bei Zimmertemperatur durchgeführt: Zu 2 ml Glucosereagenz (s.u.) wurden 0 bis 10 µl Glucosestandard (5 mM in 0.33 M $HClO_4$) bzw Kulturüberstand (1:10 verdünnt mit 0.33 M $HClO_4$)

pipettiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktionsänderung bei λ_{420} im Gilford-Spectrophotometer 250 mit Schreiber gegen einen Leerwert mit gleicher $HClO_4$-Menge. Die Reaktionszeit betrug 20 min. Unter den angegebenen Testbedingungen ergaben 10 nmol Glucose eine Extinktionsänderung von $\Delta E_{420} = 0.23$. Im Konzentrationsbereich von 5 bis 50 nmol Glucose pro Testansatz war die Extinktionsänderung der eingesetzten Glucosemenge proportional.

Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure, Glutathion etc. setzen die wiedergefundene Glucosemenge um 10 bis 15 % herab (7). Durch die Zugabe eines internen Glucosestandards wurde gefunden, daß die dem Medium zugesetzte Na_2S/Cystein-Lösung in der verwendeten Konzentration die Glucosemenge um ca. 5 % verringert. Die Meßwerte aus den Medien- und Kulturüberständen wurden daher mit diesem Wert korrigiert.

Das Glucosereagenz enthielt pro ml 0.12 M K-Phosphat-Puffer (pH 7.0) 0.5 mg ABTS, 8 Einheiten GOD und 4 Einheiten POD.

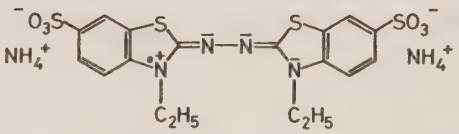


Abb. 3: Radikalkation von 2.2'-Azino-bis-(3-äthyl-benzthiazolin)-6-sulfonsäure- $(NH_4)_2$ als erste Oxidationsstufe

2.3.2. Bestimmung von Acetat

Acetat wurde in einem gekoppelten optischen Test unter Verwendung von Acetyl-CoA-Synthetase (AcCoA-Synt.; EC 6.2.1.1), Myokinase (MK; EC 2.7.4.3), Pyruvatkinase (PK; EC 2.7.1.40) und Lactat-Dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) als Hilfsenzyme bestimmt. Es wurde die Abnahme der NADH-Konzentration photometrisch verfolgt.

Testreaktion

$$\text{Acetat} + \text{CoA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{AcCoA-Synt.}} \text{AMP} + \text{AcCoA} + \text{PP}_a$$

$$\text{AMP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MK}} 2\ \text{ADP}$$

$$2\ \text{ADP} + 2\ \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} 2\ \text{Pyruvat} + 2\ \text{ATP}$$

$$2\ \text{Pyruvat} + 2\ \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} 2\ \text{NAD} + 2\ \text{Lactat}$$

Der Test wurde in Glasküvetten (d = 1 cm) mit Deckplatte und Schliff unter N_2 als Schutzgas bei 37 °C durchgeführt. Hierzu wurden 1 ml Testreagenz (s.u.) in die Küvetten gefüllt, mit einem Stopfen verschlossen und erneut unter N_2 anaerobisiert. Nach Äquilibrierung bei 37 °C wurden jedem Testansatz 4 Einheiten PK, 3 Einheiten LDH, 0.72 Einheiten MK und 0.1 Einheiten AcCoA-Synt. zugegeben. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei λ_{365} im Gilford-Spectrophotometer 250 mit Schreiber gegen einen Leerwert mit H_2O anstelle der Acetatlösung. Innerhalb der ersten 10 min nahm die Extinktion bis zum Erreichen einer konstanten "Schleichreaktion" von ca. 0.01 pro 10 min ab. Erst jetzt erfolgte der Start der eigent-

lichen Reaktion durch Zugabe einer Acetat-Standardlösung (5 µl 25 mM Na-Acetat) bzw. der Kulturüberstände (5 µl, 1:10 verdünnt). Die Reaktionszeit betrug 35 bis 40 min. Unter Berücksichtigung der Schleichreaktion vor und nach der eigentlichen Reaktion wurde aus der Extinktionsänderung die Acetatkonzentration im Kulturmedium bestimmt. Unter den angegebenen Bedingungen ergaben 125 nmol Acetat eine Extinktionsänderung von $\Delta E_{365} = 0.80$.

Das Testreagenz enthielt 100 mM TRIS-HCl pH 7.6; 1 mM $MgCl_2$; 2.5 mM KCl; 0.5 mM NADH; 1.5 mM ATP; 2 mM Coenzym A und 2 mM Phosphoenolpyruvat-K (PEP). Die Substanzen wurden im Puffer gelöst und an der Wasserstrahlpumpe durch häufiges Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Danach erfolgte die Zugabe von Glutathion anaerob bis zu einer Endkonzentration von 1 mM.

2.3.3. Bestimmung von Äthanol

Der Nachweis von Äthanol im Medium erfolgte enzymatisch mit Alkohol-Dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1). Es wurde die Bildung von NADH photometrisch verfolgt. Da das Gleichgewicht der Reaktion bei pH 7 ganz auf der Seite von Äthanol und NAD liegt, wurde Semicarbazid zum Abfangen von Acetaldehyd zugegeben und ein Puffer mit einem pH von 8.7 zum Abfangen der Protonen verwendet (9).

Testreaktion:

$$\text{Äthanol} + \text{NAD} \xrightarrow[\text{pH 8.7}]{\text{ADH}} \text{NADH} + \text{Acetaldehyd}$$

$$\text{Acetaldehyd} + \text{Semicarbazid} \longrightarrow \text{Aldehydsemicarbazon}$$

Der Test wurde in Glasküvetten (d = 1 cm) mit Deckel bei 37 °C durchgeführt: Zu 3 ml Pufferlösung (s.u.) wurden 0.1 ml NAD-Lösung (24 mM) und 0 bis 200 µl Äthanolstandard-Lösung (0.2 mM) bzw. Kulturüberstand (1:10 verdünnt mit H_2O) pipettiert. Die Testlösung wurde mit dest. Wasser auf ein Endvolumen von 3.3 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 180 Einheiten ADH zum Testansatz erfolgte die Messung der Extinktionsänderung bei λ_{366} im Gilford-Spectrophotometer 250 mit Schreiber gegen einen Leerwert ohne Äthanol. Die Reaktionszeit betrug etwa 30 min. Unter den angegebenen Bedingungen ergaben 100 nmol Äthanol eine Extinktionsänderung von $\Delta E_{366} = 0.10$. Im Konzentrationsbereich von 50 bis 400 nmol Äthanol pro Testansatz war die Extinktionsänderung der eingesetzten Äthanolmenge proportinal.

Die Pufferlösung enthielt 75 mM Na-Pyrophosphat, 75 mM Semicarbazid x HCl und 21 mM Glycin. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 4 N NaOH auf pH 8.7 eingestellt.

2.3.4. Bestimmung von Wasserstoff

Die Bestimmung von Wasserstoff erfolgte gaschromatographisch (36). Nach Trennung auf einem Molekularsieb wurde H_2 mit einem Wärmeleitsfähigkeitsdetektor nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte über die Peakhöhe durch Vergleich mit einem Eichgemisch.

Als Gerät wurde der Aerograph 1400 mit Schreiber A-25 von der Fa. Varian, München verwendet. Die Trennung erfolgte in einer Edelstahlsäule ($\varnothing_a$ 3.2 mm, $\varnothing_i$ 2 mm, Länge 2.2 m), die mit Molekularsieb 5 Å gefüllt war. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 25 ml min^{-1} in Trenn- und Referenzsäule bei einem Eingangsdruck von 4 Atm.-Überdruck. Die Bestimmung erfolgte bei einer Injektortemperatur von 80 °C, einer Säulentemperatur von 110 °C und einer Detektortemperatur von 140 °C. Der Detektor wurde bei einer Stromstärke von 115 mA betrieben.

Das Aufbringen der Proben von 0.15 bzw. 0.25 ml erfolgte mit einer Tuberkulinspritze aus Glas (Vol. 0.5 ml; Kanüle ø 0.5 mm, Länge 23 mm; Henke-Sass Wolf, Tuttlingen), die mit Silikonfett (mittelviskös) gasdicht gemacht wurde. Unter den oben angegebenen Bedingungen ergaben 2.5 µl H_2 in einer 0.25 ml-Probenmenge bei einer Abschwächung von 16 einen Schreiberauschlag von 115.5 mm mit einer Standardabweichung von 1.2 mm.

3. Aktivitätsbestimmung von Enzymen

Der Nachweis von Enzymaktivitäten in *R. albus* erfolgte mit zellfreien Extrakten. Hierzu wurden 1 g Feuchtzellen in 3 ml anaeroben MOPS-Puffer (50 mM Morpholino-3-propansulfonsäure-K, pH 7.0) mit 2 mM Dithioerythrit (DTE) und 0.2 mg. ml^{-1} Desoxyribonuclease (DNase; EC 3.1.4.5) bei 0 °C unter Stickstoff suspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der French-Press (Fa. Aminco, Silver Spring, USA) bei 1 000 Atm.-Überdruck unter N_2 als Schutzgas aufgebrochen. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 37 °C zur Zerstörung der DNS. Jetzt wurde auf 0 °C abgekühlt und 20 min bei 20 000 x g abzentrifugiert (RC-5 Superspeed, Fa. Du Pont-Sorvall). Dies erfolgte unter N_2 als Gasphase in einem 10 ml-Polycarbonatröhrchen, das mit einem Butylkautschukstopfen verschlossen war. Nach der Zentrifugation wurde der zellfreie Überstand mit Hilfe einer Doppelkanüle in ein Serumgläschen unter N_2 überführt. In einigen Fällen wurde der zellfreie Extrakt sofort zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Allgemein wurde der Extrakt jedoch bei -20 °C eingefroren, da die meisten Enzyme auch nach einer Aufbewahrungszeit von einigen Wochen mit unveränderter Aktivität nachgewiesen werden konnten.

Bei einigen Bestimmungen von Enzymen war es notwendig, einen zellfreien Extrakt zu verwenden, der kein Coenzym A enthielt. Zu diesem CoA-freien Extrakt gelangte man durch Behandlung des Extraktes mit Ionenaustauschern und Aktivkohle (31). Es wurden 1 g Dowex-Acetat und 100 mg Aktivkohle mit 5 ml

TRIS-Acetat (50 mM, pH 7.5) versetzt und unter häufigem Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Dithioerythrit bis zu einer Endkonzentration von 2 mM. Unter N_2 als Schutzgas wurde die Suspension in eine Chromatographiesäule (ø 1 cm, Länge 20 cm, mit Adaptoren; Fa. Fluka, Buchs, CH) überführt und mit 20 ml Elutionspuffer (50 mM TRIS-Acetat, pH 7.5 mit 2 mM DTE, anaerob) äquilibriert. Jetzt wurden 2 ml des zellfreien Extraktes von *R.albus* unter N_2 auf die Säule gegeben und mit Puffer eluiert. Bei sichtbarer Verfärbung des Eluates wurden ca. 2 ml anaerob in einem Serumgläschen aufgefangen. Der CoA-freie Extrakt wurde sofort zur Analyse der Enzymaktivität eingesetzt.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Biuret-Methode bestimmt (4). Sie betrug im zellfreien Extrakt 25 bis 30 mg, im CoA-freien Extrakt dagegen etwa 15 mg Protein pro ml Extrakt.

3.1. Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)

Die Enzymaktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) wurde photometrisch bestimmt, wobei die Bildung von NADH verfolgt wurde. Es wurde Arsenat anstelle von Phosphat verwendet, um die Reaktion irreversibel zu gestalten (75). In einer vorgeschalteten Hilfsreaktion wurde Glycerinaldehyd-

phosphat (GAP) durch Aldolase (EC 4.1.2.13) aus Fructose-1,6-bis-phosphat (FDP) regeneriert (DHAP= Dihydroxyacetonphosphat; 3-PG = 3-Phosphoglycerat).

$$FDP \xrightarrow{\text{Aldolase}} GAP + DHAP$$

$$GAP + NAD \xrightarrow[H_2AsO_4^-]{\text{GAP-DH}} NADH + 3\text{-}PG$$

Der Test wurde bei 37 ^{o}C in reduzierten Glasküvetten (d = 1 cm, verschlossen mit einem Gummistopfen) unter N_2 als Schutzgas durchgeführt, da der Zellextrakt eine aktive NADH-Oxidase enthielt. Der 1 ml-Testansatz enthielt 50 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 5 µmol KH_2AsO_4; 5 µmol Fructose-1,6-bisphosphat; 1 µmol NAD; 1 µmol Glutathion; 1 Einheit Aldolase und 5 bis 20 µl zellfreien Extrakt. Nach dem Start der Reaktion mit Extrakt wurde die Extinktionsänderung bei λ_{365} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 mit Schreiber verfolgt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten für NADH von ε_{365} = 3 300 $M^{-1}cm^{-1}$ (48).

3.2. Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.2.7.1)

Die Enzymaktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pyr:Fd-OR) wurde anhand der Reduktion von Ferredoxin bestimmt. Um eine Re-Oxidation von Ferredoxin durch die im Extrakt vorhandene Hydrogenase zu verhindern, wurde der Test unter einer CO-Atmosphäre durchgeführt, wodurch die Hydroge-

nase zu 100 % gehemmt wurde. Da Acetyl-Coenzym-A (AcCoA) die Oxidation von Pyruvat mit Ferredoxin hemmte, wurde durch Zugabe von Arsenat und Phosphotransacetylase (PTA, EC 2.3.1.8) zum Testansatz der Thioester hydrolysiert.

$$\text{Pyr} + \text{CoA} + \text{Fd}_{ox} \xrightarrow{\text{Pyr:Fd-OR}} \text{AcCoA} + \text{Fd}_{red} + \text{CO}_2$$

$$\text{AcCoA} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{H}_2\text{AsO}_4^-]{\text{PTA}} \text{Acetat} + \text{CoA}$$

Der Test wurde bei 37 °C in reduzierten Glasküvetten (d = 1 cm) durchgeführt, die mit einem Gummistopfen verschlossen und über eine Kanüle evakuiert und mit CO gefüllt waren. Der 1 ml-Testansatz enthielt 50 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 10 µmol Na-Pyruvat; 10 µmol KH_2AsO_4; 1 µmol Thiamin-Pyrophosphat-Cl; 50 nmol Coenzym A ; 2 µmol DTE; 4 Einheiten PTA; ca. 25 nmol Ferredoxin von *C. pasteurianum* und 0.5 µl zellfreien Extrakt von *R. albus*. Vor Zugabe von Ferredoxin und Extrakt wurden die Küvetten für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um restliche Sauerstoffmengen durch DTE reduzieren zu lassen. Nach Start der Reaktion mit zellfreiem Extrakt wurde die Extinktionsänderung bei λ_{405} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 mit Schreiber verfolgt. Bei der Auswertung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient für Ferredoxin aus *C. pasteurianum* von ε_{405} = 29 600 M^{-1} cm^{-1} für die oxidierte Form und ε_{405} = 16 000 $M^{-1}cm^{-1}$ für die reduzierte Form zugrundegelegt (kalkuliert nach Uyeda und Rabinowitz; 74).

3.3. NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.6.7.?)

Die Enzymaktivität der NADH:Fd-Oxidoreduktase wurde unter Verwendung von Hydrogenase als Hilfsenzym gemessen, wobei die gebildeten Mengen an molekularem Wasserstoff gaschromatographisch verfolgt wurden (32).

$$NADH + H^+ + Fd_{ox}^{++} \xrightarrow{\text{NADH:Fd-OR}} Fd_{red} + NAD^+ + 2\ H^+$$

$$Fd_{red} + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} H_2 + Fd_{ox}^{++}$$

Da die Bildung von H_2 durch Reduktion von H^+ ($E^{o'}$= -414 mV) mit NADH ($E^{o'}$ = -320 mV ; 69) thermodynamisch nicht begünstigt ist, wurde gebildetes NAD^+ kontinuierlich mit Galactose und Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH; EC 1.1.1.48) rereduziert, um ein möglichst hohes NADH/NAD- Verhältnis aufrechtzuerhalten.

$$NAD^+ + \text{Galactose} \xrightarrow{\text{Gal-DH}} NADH + H^+ + \text{Galactotonolacton}$$

Im Ergebnisteil wird beschrieben, daß die NADH:Ferredoxin-Oxidoreductase von *R. albus* obligat Acetyl-CoA als Aktivator benötigt. Da in zellfreien Extrakten Acetyl- CoA mit NADH schnell zu Acetaldehyd reduziert wird, wurde dem Test routinemäßig ein Acetyl-CoA regenerierendes System zugefügt, bestehend aus Acetylphosphat (AcP), Coenzym A (CoA) und Phosphotransacetylase (PTA; EC 2.3.1.8).

$$AcP + CoA \xrightarrow{PTA} AcCoA + P_a$$

Der Test wurde in Glasröhrchen (ø 16 mm, Länge 50 mm, Wandstärke 1.5 mm) mit 1 ml Flüssig- und 4.6 ml Gasphase bei 37 °C anaerob durchgeführt. Jeder Testansatz enthielt 100 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 10 nmol FAD; 2 µmol $MgSO_4$; 2.5 µmol $MnCl_2$; 20 µmol Galactose; 2.5 µmol NADH-K_2Na_2; 20 µmol AcP-LiK; 0.5 µmol CoA; 10 nmol Ferredoxin aus *C. pasteurianum*; 1 Einheit Gal-DH; 5 Einheiten PTA; 2 µmol DTE und 0 bis 200 µl Extrakt. Alle Substanzen bis auf Ferredoxin, DTE, die Enzyme und den Extrakt wurden als Stammlösungen in die Teströhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden mit einem Weichgummistopfen verschlossen und an der Wasserstrahlpumpe über eine Kanüle durch häufiges Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Danach erfolgte die Zugabe von Ferredoxin, PTA, Gal-DH und DTE aus anaerobisierten Stammlösungen. Die Röhrchen wurden bei 37 °C im Reziprokschüttler (Fa. Köttermann, Hänigsen) bei einer Frequenz von 4 Hz liegend inkubiert. Nach einer Vorinkubation von 30 min erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von Extrakt. Bei einer Reaktionszeit von 20 bis 60 min wurde der Ansatz durch Zugabe von 0.4 ml 40 % Perchlorsäure gestoppt. Vor Entnahme von Gasproben wurde die Gasphase mit der Flüssigkeit durch Schütteln (15 min bei Zimmertemperatur) äquilibriert. Die Bestimmung des gebildeten Wasserstoff erfolgte wie unter 2.3.4. im Methodenteil beschrieben (s. S. 20).

3.4. Ferredoxin-Hydrogenase (EC 1.12.7.1)

Die Enzymaktivität der Ferredoxin-Hydrogenase wurde bestimmt anhand der Reduktion von Methylviologen (MV) mit molekularem Wasserstoff (71). Methylviologen ist ein autoxi-

dabler Redoxfarbstoff mit einem Elektronenübergang von n = 1 und einem negativen Redoxpotential von $E^{o'}$ = -446 mV (28). Durch die charakteristische Blaufärbung im reduzierten Zustand läßt sich MV photometrisch bestimmen.

$$H_2 + 2\ MV^{+}_{ox} \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} 2\ H^{+} + 1\ MV_{red}$$

Der Test wurde bei 37 °C in reduzierten Glasküvetten (d = 1 cm) durchgeführt, die mit einem Gummistopfen verschlossen und über eine Kanüle evakuiert und mit H_2 oder Gasgemisch (s.u.) gefüllt waren. Der 1 ml-Testansatz enthielt 50 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 50 µmol Mercaptoäthanol; 10 µmol Methylviologen und 5 bis 20 µl verdünnten zellfreien Extrakt (1:100). Vor Start der Reaktion mit Extrakt wurden einige µl einer etwa 10 mM Na-Dithionitlösung bis zum Erreichen einer sehr schwachen, aber beständigen Blaufärbung zugegeben, um auch letzte Sauerstoffspuren aus den Küvetten zu entfernen. Die Extinktionsänderung wurde bei λ_{578} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 mit Schreiber verfolgt. Zur Auswertung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient für Methylviologen von ε_{578} = 9 700 M^{-1} cm^{-1} zugrunde gelegt (33).

Gasgemische mit genauer Konzentration an H_2 und/oder CO wurden in einem graduierten 600 ml-Gassammelrohr mit Ausgleichsgefäß unter Verwendung von alkalischer Dithionitlösung mit N_2 als Trägergas hergestellt.

3.5. Acetaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.10)

Die Enzymaktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase wurde in einem gekoppelten optischen Test bestimmt. Acetyl-Coenzym-A (AcCoA) wurde in einer vorgeschalteten Reaktion aus Acetylphosphat (AcP) mit Phosphotransacetylase (PTA; EC 2.3.1.8) regeneriert. Entstehendes Acetaldehyd wurde mit Alkohol-Dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.1) zu Äthanol reduziert.

$$\text{AcP} + \text{CoA} \xrightarrow{\text{PTA}} \text{AcCoA} + P_a$$

$$\text{AcCoA} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{Aldehyd-DH}} \text{Acetaldehyd} + \text{NAD} + \text{CoA}$$

$$\text{Acetaldehyd} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Äthanol} + \text{NAD}$$

Der Test wurde bei 37 °C in reduzierten Glasküvetten (d= 1 cm, verschlossen mit einem Gummistopfen) unter N_2 als Schutzgas durchgeführt. Der 1 ml-Testansatz enthielt 100 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 5 µmol AcP-LiK; 0.3 µmol NADH-K_2Na_2; 0.5 µmol CoA; 2 µmol Dithioerythrit; 4 Einheiten PTA; 90 Einheiten ADH und 2 µl zellfreien Extrakt. Nach Vorinkubation von 30 min bei 37 °C zur Bildung von AcCoA erfolgte der Start durch Zugabe von zellfreiem Extrakt. Die Extinktionsänderung wurde bei λ_{365} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 mit Schreiber verfolgt. Zur Auswertung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient für NADH von $\varepsilon_{365} = 3\,300\ M^{-1}cm^{-1}$ zugrunde gelegt (48).

3.6. Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1)

Die Enzymaktivität der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) wurde photometrisch bestimmt durch Messung der Reduktion von Acetyldehyd mit NADH.

$$\text{Acetaldehyd} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Äthanol} + \text{NAD}$$

Der Test wurde bei 37 °C in reduzierten Glasküvetten (d = 1 cm, verschlossen mit einem Gummistopfen) unter N_2 als Schutzgas durchgeführt. Der 1 ml-Testansatz enthielt 50 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 1 µmol Acetaldehyd; 0.3 µmol NADH-K_2Na_2 und 5 µl zellfreien Extrakt. Erst nach dem Anaerobisieren durch Evakuieren und Begasen wurde Acetaldehyd zugegeben. Nach Start mit zellfreiem Extrakt wurde die Extinktionsänderung bei λ_{365} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 mit Schreiber verfolgt. Zur Auswertung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient für NADH von ε_{365} = 3 300 $M^{-1}cm^{-1}$ zugrunde gelegt (48).

3.7. Phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8)

Die Phosphotransacetylase (PTA) katalysiert die Hydrolyse von Acetylphosphat (AcP) in Gegenwart von Kalium-Arsenat und Coenzym A (61).

$$AcP + H_2O \xrightarrow[CoA,\ H_2AsO_4^-]{PTA} Acetat + P_a$$

Unter Ausnutzung dieser Reaktion wurde die Aktivität der PTA in zellfreien Extrakten von *R. albus* nachgewiesen (63). Der Verbrauch an AcP wurde verfolgt, wobei vorhandenes AcP als Acetyl-Hydroxamat-Eisen-Komplex photometrisch bestimmt wurde.

$$AcP + H_2NOH \longrightarrow AcNHOH + P_a$$

$$3\ AcNHOH + Fe^{III} \xrightarrow[H^+]{} (AcNHOH)_3Fe^{III}$$

Der Test wurde bei 25 °C in 10 ml-Zentrifugengläschen (mit Gummistopfen verschlossen) unter N_2 als Schutzgas durchgeführt. Der 1 ml-Testansatz enthielt 20 µmol TRIS-HCl pH 7.8; 50 µmol KH_2AsO_4 pH 7.8; 10 µmol Cystein-HCl; 0.5 µmol $(NH_4)_2SO_4$ pH 7.8; 4 µmol AcP-LiK; 30 nmol CoA; 2 µmol Dithioerythrit und 5 µl zellfreien Extrakt. Die Reaktion wurde gestartet mit Extrakt, der mit 0.2 M Ammoniumsulfat stabilisiert worden war (1). Nach einer Reaktionszeit von 1, 2, 3 oder 4 min wurde der Testansatz gestoppt durch gleichzeitige Zugabe von 1 ml Hydroxylaminlösung (s.u.) und 1 ml 100 mM Na-Acetat (pH 5.4).

Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min bei 25 °C und anschließend die Zugabe von 1 ml Eisenreagenzlösung (s.u.). Der Testansatz wurde für 5 min bei maximaler Beschleunigung in einer Tischzentrifuge (Piccolo; Fa. Haereus Christ, Osterode) abzentrifugiert. Die Extinktionsmessung des Überstandes erfolgte in einer Küvette (d = 1 cm) bei λ_{546} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 gegen einen Leerwert ohne AcP und Extrakt. Unter den gegebenen Bedingungen ergaben 4 µmol AcP eine Extinktionsänderung von $\Delta E_{546} = 0.41$; das entspricht einem molaren Extinktionskoeffizienten für den Acetyl-Hydroxamat-Eisen-Komplex von $\varepsilon_{546} = 620\ M^{-1}cm^{-1}$.

Die Hydroxylaminlösung wurde vor jedem Versuchsbeginn frisch zubereitet aus gleichen Teilen von 4 M Hydroxylamin-HCl und von 3.5 M NaOH. Der pH sollte 6.4 betragen (38).

Die Eisenreagenzlösung bestand zu gleichen Teilen aus 3 N HCl, einer Trichloressigsäure-Lösung (12 %; G/Vol) und einer $FeCl_3$-Lösung (5 % $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ in 0.1 N HCl). Sie war über mehrere Wochen haltbar.

3.8. Phosphoglycerat-Kinase (EC 2.7.2.3)

Die Enzymaktivität der 3-Phosphoglycerat-Kinase (PG-K) wurde unter Verwendung von Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAP-DH; EC 1.2.1.12) als Hilfsenzym gemessen, wobei die Abnahme an NADH photometrisch verfolgt wurde (8).

$$3\text{-PG} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{PG-K}} 1.3\text{-bis-PG} + \text{ADP}$$

$$1.3\text{-bis-PG} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GAP-DH}} \text{NAD} + \text{GAP} + P_a$$

Der Test wurde bei 37 ^{o}C in reduzierten Glasküvetten (d = 1cm, verschlossen mit Gummistopfen) unter N_2 als Schutzgas durchgeführt, da der Zellextrakt eine aktive NADH-Oxidase besaß. Der 1 ml-Testansatz enthielt 78.3 µmol Triäthanolamin-Puffer, pH 7.6; 0.9 µmol EDTA; 0.2 µmol NADH-Na_2K_2; 1.1 µmol ATP-Na_2; 6.2 µmol 3-Phosphoglycerat-Na_3; 2 µmol $MgSO_4$; 0.5 µmol $MnCl_2$; 5 Einheiten GAP-DH und 5 µl zellfreien Extrakt. Nach Start der Reaktion mit Extrakt wurde die Änderung der Extinktion bei λ_{365} im Zeiss-Filterphotometer PL 4 mit Schreiber verfolgt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten für NADH von ε_{365} = 3 300 $M^{-1}cm^{-1}$ (48).

3.9. Acetat-Kinase (EC 2.7.2.1)

Die Enzymaktivität der Acetat-Kinase (AK) wurde in einem gekoppelten optischen Test photometrisch bestimmt. In zwei nachgeschalteten Hilfsreaktionen mit Hexokinase (HK; EC 2.7.1.1) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH; EC 1.1.1.49) wurde erreicht, daß die Bildung von Acetat anhand einer NADH-Bildung gemessen werden konnte.

$$\text{AcP} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{AK}} \text{ATP} + \text{Acetat}$$

$$\text{ATP} + \text{Glucose} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{NADPH} + \text{6-P-Gluconolacton}$$

Der Test wurde bei 37 °C in reduzierten Glasküvetten (d = 1 cm, verschlossen mit einem Stopfen) unter N_2 als Schutzgas durchgeführt. Der 1 ml-Testansatz enthielt 50 µmol MOPS-Puffer pH 7.0; 5 µmol $MgCl_2$; 1 µmol AcP-LiK; 0.5 µmol ADP-Na_2; 20 µmol Glucose, 0.5 µmol NADP-Na_2; 7 Einheiten HK; 3.5 Einheiten G6P-DH und 2 µl zellfreien Extrakt. Nach dem Start der Reaktion mit AcP wurde die Extinktionsänderung bei λ_{365} im Zeiss-Filterphotmeter PL 4 mit Schreiber verfolgt. Da ATP auch in Abwesenheit von AcP über die Adenylatkinase-Reaktion aus ADP gebildet wurde, mußte die Zunahme der Extinktionsänderung der Berechnung zugrunde gelegt werden. Zur Auswertung wurde ein molarer Extinktionskoeffizient für NADPH von $\varepsilon_{365} = 3\,300\ M^{-1}cm^{-1}$ verwendet (48).

4. Isolierung und Analyse von Ferredoxin

In diesem Kapitel wird die Methode zur Isolierung von Ferredoxin aus *R. albus* beschrieben. Weiterhin enthält der Abschnitt die Analyse des Eisen-Schwefel-Proteins in Bezug auf das Molekulargewicht, die Aminosäurezusammensetzung, den Gehalt an Eisen und Schwefel sowie das Redoxverhalten.

4.1. Isolierung von Ferredoxin

Ferredoxin aus *R. albus* wurde in Anlehnung an das von Schönheit (56) beschriebene Verfahren isoliert. Dieses Verfahren zeichnet sich aus durch Verwendung von zum Teil ungewöhnlichen Schritten und durch kurze Präparationszeit. Es umfaßt die folgenden Einzelschritte: Zellaufschluß, Acetonfällung, Polyäthylenimin-Fällung, Adsoprtion an DEAE-Cellulose und Kristallisation. Die Herstellung des zellfreien Extraktes erfolgte unter anaeroben Bedingungen (N_2 als Gasphase) bei 0 °C , alle weiteren Schritte wurden aerob bei 0 °C im Eisbad durchgeführt. Die verwendeten Ammoniumsulfat-Lösungen besaßen einen pH von 6.8, ihre Konzentrationsangaben beziehen sich auf eine bei 0 °C zu 100 % gesättigte Lösung.

Zellaufschluß: 50 g eingefrorene Feuchtzellen wurden in 75 ml anaerobisiertem dest. H_2O homogen suspendiert. In dem Wasser waren zuvor 0.15 mmol Dithioerythrit und 5 mg Desoxyribonuclease (EC 3.1.4.5) gelöst. Nach Passieren einer French

Press (1 000 Atm.-Überdruck; Fa. Aminco, Silver Spring , USA) erfolgte eine Inkubation der nun aufgeschlossenen Zellen bei 37 °C für 30 min, um DNS abzubauen. Nach Abkühlen auf 0 °C wurde der pH-Wert mit 1 N TRIS-Base oder 1 N Essigsäure auf pH 6.5 und mit festem NaCl die Leitfähigkeit entsprechend der einer 100 mM NaCl- Lösung eingestellt. Die Suspension wurde in einem 250 ml-Nylonzentrifugenbecher mit Schraubkappe abzentrifugiert (20 000 x g, 20 min, RC-5 Superspeed; Fa. Du Pont-Sorvall). Das Sediment wurde verworfen und der zellfreie Überstand in einen zweiten Nylonbecher überführt.

Acetonfällung: Unter sehr starkem Rühren erfolgte die Zugabe an Aceton (- 20 °C) bis zu einer Endkonzentration von 55 Vol-%, das sind etwa 1.2 ml Aceton pro g zellfreiem Überstand. Anschließend wurde die Suspension bei niedriger Geschwindigkeit noch weitere 5 min gerührt und danach abzentrifugiert (20 000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand enthielt das gelöste Ferredoxin.

Polyäthylenimin-Fällung: Zur Fällung von Ferredoxin aus dem Acetonüberstand wurde Polymin P verwendet, ein Polyäthylenimin mit einem Molekulargewicht von etwa 20 000. Die Zugabe an Polymin P (10 % wäßrige Lösung, pH 6.5 eingestellt mit konzentrierter Essigsäure) erfolgte tropfenweise unter schnellem Rühren bis zu einer Endkonzentration von 0.5 %. Anschließend wurde etwa 3 min lang nachgerührt. Der Polyäthylenimin-Ferredoxin-Komplex fiel als braunschwarze klebrige Flocken aus. Die Suspension wurde bei 20 000 x g 10 min lang abzentrifugiert. Der gelbe, durch Resazurin aus dem Kulturme-

dium (s.S.10) leicht rötlich gefärbte Überstand wurde verworfen. Das Ferredoxin-haltige Sediment wurde in 60 % Ammoniumsulfat (2 ml pro 10 g Feuchtzellen) mit Hilfe eines Glasstabes und etwas Seesand (z.A., Merck) resuspendiert. Diese Suspension wurde abzentrifugiert (20 000 x g, 5 min) und der Überstand in ein 30 ml-Zentrifugenröhrchen aus Polyäthylen überführt.

Adsorption an DEAE-Cellulose bei hoher Ionenstärke:
Das in 60 % Ammoniumsulfat gelöste Ferredoxin wurde an DEAE-Cellulose adsorbiert. Hierzu wurden pro 10 g Feuchtzellen 1 ml einer DE 52-Suspension (1 g DE 52 in 6 ml 60 % Ammoniumsulfat) mit der Ferredoxinlösung versetzt und 20 min bei 0 ^{o}C auf einem Reziprokschüttler langsam geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert (48 000 x g, 10 min) und der Überstand mit dem abgetrennten Polymin P verworfen. Das schwarzbraune Sediment wurde zweimal in 60 % Ammoniumsulfat (1 ml pro 1 g Feuchtzellen) gewaschen. Aus dem so gereinigten DE 52-Ferredoxin-Komplex wurde Ferredoxin mit 10 % Ammoniumsulfat (2 ml pro 10 g Feuchtzellen) unter kräftigem Schütteln herausgelöst. Nach der Zentrifugation bei 48 000 x g (5 min) enthielt der Überstand das Ferredoxin.

Kristallisation: Das in 10 % Ammoniumsulfat gelöste Ferredoxin (ca. 8 ml) wurde gegen 90 % Ammoniumsulfat (2 l) dialysiert (Dialyseschlauch, Fa. Union Carbide, Chicago, USA). Das nach 6 Stunden auskristallisierte Ferredoxin wurde abzen-

trifugiert (27 000 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Ferredoxin wurde einmal mit 2 ml 90 % Ammoniumsulfat gewaschen, in 1 ml 90 % Ammoniumsulfat resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Nachreinigung: Die Nachreinigung von Ferredoxin wurde durch DE 52-Säulenchromatographie in 60 % Ammoniumsulfat durchgeführt. Hierzu wurde eine Glassäule mit Adaptoren (ø 1 cm, Länge 20 cm, Fa. Fluka, Buchs, CH) mit entgaster DE 52 Cellulose (1 g in 6 ml 60 % Ammoniumsulfat) gefüllt. Nach dem Äquilibrieren bei 4 °C im Kühlraum wurde das in 60 % Ammoniumsulfat gelöste Ferredoxin aufgetragen. Unter diesen Bedingungen adsorbierte Ferredoxin fest an DEAE-Cellulose, was durch Bildung einer dunkelbraunen Bande im oberen Bereich der Säule sichtbar wurde. Nach Waschen der Säule mit ca. 50 ml 60 % Ammoniumsulfat wurde mit ca. 40 ml 40 % Ammoniumsulfat nachgewaschen. Dabei verbreiterte sich die Ferredoxinbande über die gesamte Säulenfüllung. Jetzt wurde Ferredoxin mit 10 % Ammoniumsulfat (ca. 5 ml) eluiert, wobei 0.5 ml-Fraktionen aufgefangen wurden. Die Fraktionen mit einem $\Delta E_{390}/\Delta E_{280}$ Quotienten von 0.74 wurden vereinigt und gegen 90 % Ammoniumsulfat dialysiert (Bedingungen s.S. 36). Dieses hochgereinigte Ferredoxin wurde zur Aminosäureanalyse und zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten eingesetzt.

4.2. Bestimmung von Eisen

Der Gehalt an Nicht-Häm-Eisen im Ferredoxin aus *R. albus* wurde in Anlehnung an das von Doeg und Ziegler beschriebene Verfahren bestimmt (18). Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft von Bathophenanthrolin, in alkoholischer Lösung bei einem pH von 4.5 und reduzierenden Bedingungen Fe(II)-Ionen unter Bildung eines Farbkomplexes zu binden, der bei λ_{535} photometriert werden kann (Abb. 4). Um den Leerwert der Messung niedrig zu halten, wurden alle Glasgefäße und Stopfen vor Benutzung mit 0.1 N HCl und dest. Wasser gewaschen. Die Zugabe von Flüssigkeiten erfolgte mit Glas- bzw. Eppendorfpipetten.

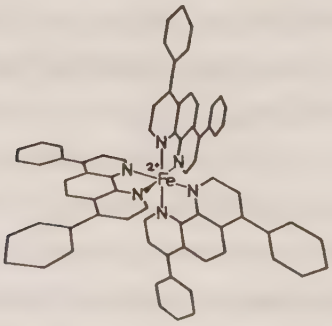


Abb. 4: Bathophenanthrdin-Eisen-Komplex, bestehend aus 1 Fe^{2+}-Ion und 3 Molekülen Bathophenanthrolin. Die konjugierten Doppelbindungen wurden nicht eingezeichnet.

Von der Eisenstandardlösung (ca. 30 µM an Ammoniumeisensulfat in H_2O) bzw. von der Ferredoxinlösung (ΔE_{390} = 0.1) wurden 0 bis 1.0 ml in 15 ml-Reagenzgläser pipettiert, die nach Auffüllen mit H_2O auf 1.0 ml und durch Zugabe von 1.5 ml Bathophenanthrolinlösung (16.5 mg gelöst in 50 ml 95 Vol-% Alkohol) mit einem Gummistopfen verschlossen wurden. Nach kräftigem Durchmischen des Reaktionsansatzes auf einem Vibrationsschüttler (Fa. Heidolph, Kelheim) wurden 0.25 ml einer 0.1 % Na-Dithionitlösung (in 60 mM anaerobisiertem TRIS-Acetat, pH = 8,2) hinzugegeben, um oxidiertes Eisen in reduziertes zu überführen. Fünf Minuten danach erfolgte die Zugabe von

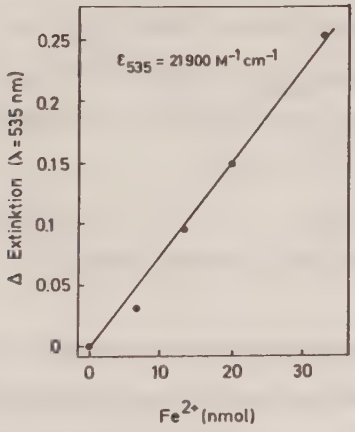


Abb. 5: Eichgerade zur Bestimmung von Eisen mit Bathophenanthrolin. Das Volumen des Testansatzes betrug 3.1 ml. Weitere Bedingungen s. Text.

0.15 ml eines 1 M Na-Acetatpuffers (pH = 4.7). Die Ansätze wurden jetzt 30 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. In dieser Zeit denatuierte Ferredoxin unter Freisetzung von Eisen. Um auch letzte Spuren von Fe^{3+} in Fe^{2+} zu überführen, wurde nochmals Na-Dithionit (0.2 ml 0.2 % in 60 mM TRIS-Acetat, pH = 8,0) zugegeben und erneut für 30 min inkubiert.

Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei λ_{535} im Zeiss-Spektralphotometer PMQ 3. Der Leerwert besaß eine Extinktion von ΔE_{535} = 0.014, gemessen gegen Luft. Die Eichgerade war im Konzentrationsbereich von 0 bis 30 nmol Eisen pro Testansatz linear (Abb. 5). Der molare Extinktionskoeffizient des Eisen-Bathophenanthrolin-Komplexes wurde zu ε_{535} = 21 900 $m^{-1}cm^{-1}$ bestimmt, in Übereinstimmung mit dem in der Literatur angegebenen Wert von ε_{533} = 22 400 $M^{-1}cm^{-1}$ (35).

4.3. Bestimmung von säurelabilem Schwefel

Der Gehalt von säurelabilem Schwefel im Ferredoxin von *R. albus* wurde nach der Methode von King und Morris bestimmt (34). Dieses Verfahren beruht auf der Bildung von Methylenblau aus 2 Molekülen N,N-Dimethyl-para-phenylendiamin und einem S^{2-}-Ion in Gegenwart von $FeCl_3$ als Katalysator (20). Methylenblau kann bei λ_{667} photometrisch bestimmt werden (Abb. 6).

Die Bildung von Methylenblau wurde unter Ausschluß von Sauerstoff bei Verwendung von anaerobisierten Lösungen durchgeführt. Alle Gefäße und Pipetten wurden vor Benutzung mit 0.1 N HCl und dest. Wasser gewaschen. Der Test wurde wie folgt durchgeführt: 13 ml-Reagenzgläser wurden mit zwischen 0.5 und 1.5 ml H_2O (je nach Probevolumen) gefüllt, mit einem Gummistopfen verschlossen und durch Evakuieren und Begasen mit N_2 anaerobisiert. Jetzt wurden 0.5 ml einer 2,6 % Zink-Acetat-Lösung und 50 µl 1 N Essigsäure in die Reagenzgläser gegeben. Nach Mischen erfolgte die Zugabe von 0 bis 1.0 ml der etwa 40 µM S^{2-} Standardlösung (s.u.) bzw. der Ferredoxinlösung (ΔE_{390} = 0.10).

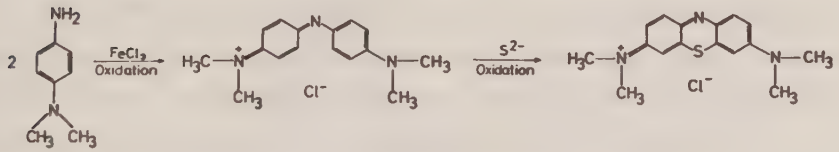


Abb. 6: Reaktionsgleichung zur Bildung von Methylenblau.

Die Testansätze wurden für 1 Stunde bei 50 °C im Wasserbad inkubiert, um den gesamten säurelabilen Schwefel im Ferredoxin in Zink-Sulfid zu überführen. Er folgte eine sukzessive Zugabe von 0.1 ml 6 % NaOH (unter starkem Schütteln), von 0.1 ml 11.5 mM $FeCl_3$ x 6 H_2O (gelöst in 0.6 N HCl) und fast gleichzeitig von 0.2 ml 1 % N,N-Dimethyl-para-phenylendiamin (gelöst in 5 M HCl). Es wurde für 2 min kräftig weitergeschüttelt, um auch

das in der Gasphase befindliche H_2S umzusetzen. Nach Aufbewahren für 1 Stunde im Dunkeln wurde die Extinktion der Proben bei λ_{667} im Zeiss-Spektralphotometer PMQ 3 gemessen. Der Leerwert des Testansatzes besaß eine Extinktion von ΔE_{667} = 0.02 (gemessen gegen Luft). Im gemessenen Konzentrationsbereich von 0 bis 40 nmol S^{2-} pro Ansatz war die Zunahme der Extinktion linear (Abb. 7). Unter den Testbedingungen ergaben 10 nmol S^{2-} pro 2.45 ml Testvolumen eine Extinktion von Δ_{667} = 0.048.

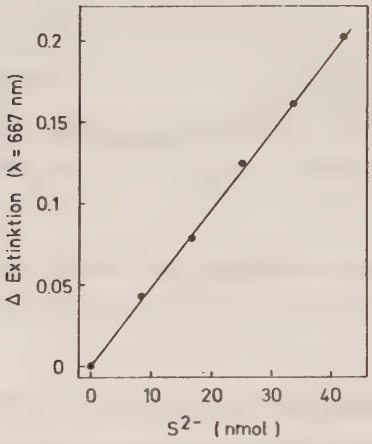


Abb. 7: Eichgerade zur Bestimmung von säurelabilem Schwefel. Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 2.45 ml. Die Bildung von Methylenblau wurde bei λ_{667} gemessen. Weitere Bedingungen s. Text.

Na_2-S-Standardlösung: Ein fester Kristall von ca. 5 g Na_2S x 9 H_2O wurde kräftig mit O_2-freiem Wasser gewaschen. Der so von Oxidationsprodukten befreite Kristall (etwa 1/2 der Ausgangsmenge) wurde in ca. 500 ml O_2-freiem Wasser gelöst. Der genaue Gehalt an Na_2S wurde jodometrisch bestimmt (27). Diese Stammlösung war ca. 20 mM an S^{2-}. Sie wurde vor Gebrauch noch etwa 1 : 500 mit O_2-freiem Wasser verdünnt, wobei eine ca. 40 µM Standardlösung erhalten wurde.

4.4. Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht von Ferredoxin aus *R. albus* wurde durch Chromatographie auf Sephadex G-50 bestimmt. Da bekannt ist, daß Ferredoxine in Elutionspuffer von 0.1 M und bei pH-Werten über 7 auf Molekularsieben im Vergleich zu ihrem Molekulargewicht zu schnell wandern (21, 39), wurde ein pH von 6.3 gewählt und Ferredoxine mit bekanntem Molekulargewicht mit als Eichsubstanzen verwendet.

Es wurden 20 g Sephadex G-50 fine in 500 ml Elutionspuffer (50 mM K-Phosphat-Puffer, pH 6.3, mit 0.02 % Na-Azid) suspendiert und nach Quellung für 1 Stunde bei 100 °C im Wasserbad abgekühlt und entgast. Eine 1 m lange Glassäule (bestehend aus 2 Chromaflex Extender 50 x 1 cm mit Adapter und 125 ml-Reservoir; Fa. Kontes, Vineland, USA) wurde mit der Sephadex-Suspension bei 4 °C im Kühlraum gefüllt. Die Säulenfüllung wurde mit 200 ml Elutionspuffer äquilibriert. Die Fließgeschwindigkeit von 20 ml h^{-1}, dem natürlichen Gefälle folgend, wurde durch Veränderung des hydrostatischen Druckes auf ca.

1.2 m Wassersäule einreguliert. Der Säulenausgang war an eine Fraktionssammlereinheit, bestehend aus UV-Detektor (λ = 280 nm, d = 3 mm) mit Schreiber, Magnetschalter, Photozelle zur Tropfenzählung und dem eigentlichen Fraktionssammler (alle Geräte Fa. LKB, Stockholm, S) angeschlossen.

Als Eichsubstanzen wurden folgende Proteine gewählt: Chymotrypsinogen A (M_r = 25 000), Myoglobin (M_r = 17 500), Ferredoxin aus *Spinacia oleracea* (Spinat, M_r = 12 500) und Ferredoxin aus *C. pasteurianum* (M_r = 6 000). Von jeder einzelnen Eichsubstanz (gelöst in 0.5 ml Elutionspuffer mit 5 % Saccharose z.A.) wurde das Elutionsvolumen V_e getrennt bestimmt.

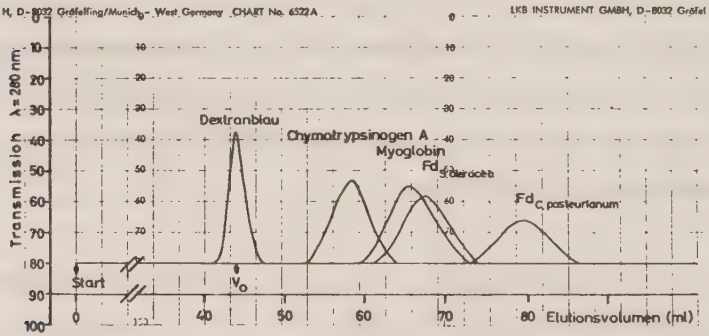


Abb. 8: Laufverhalten von Dextranblau und Eichproteinen auf Sephadex G-50 (Ø 10 mm, Länge 1 m) in 50 mM K-Phosphat-Puffer pH 6.3, zusammengefaßt aus fünf Einzelbestimmungen. Auf die Säule wurden folgende Substanzen aufgetragen, jeweils in 0.5 ml gelöst: 1 mg Dextranblau, 2 mg Chymotrypsinogen A, 2 mg Myoglobin, 1.2 mg Ferredoxin aus Spinat oder 0.4 mg Ferredoxin von *C. pasteurianum*. Genaue Bedingungen s. Text.

Vor und nach jeder Meßreihe wurde das Ausschlußvolumen V_o der Säule mit Dextranblau (M_r = 2 x 10^6) ermittelt. Die Konstanz dieses Wertes zeigte gleiche Bedingungen in allen Läufen. Es wurden Fraktionen von 50 Tropfen ≙ 3.03 ml aufgefangen. Die aus den einzelnen Läufen erhaltenen Elutionsprofile sind in der Abb. 8 zusammengefaßt.

4.5. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Ferredoxin

Kristallisiertes Ferredoxin von *R. albus* mit einem $\Delta E_{390}/\Delta E_{280}$-Quotienten von 0.74 in 90 % Ammoniumsulfat wurde abzentrifugiert und so weit wie möglich die überstehende Ammoniumsulfatlösung entfernt. Die Kristalle wurden anschließend in 1 ml 50 mM K-Phosphat-Puffer pH 6.8 aufgenommen. Die genaue Extinktionsdifferenz dieser Lösung (gemessen gegen 50 mM K-Phosphat-Puffer) wurde zu ΔE_{390} = 5.87 bestimmt. Von dieser Lösung wurde 1.0 ml in einem Duran-Glasrohr (ø 8 mm, Wandstärke 1.5 mm, Länge 20 cm) mit 1.0 ml 12 N HCl und 80 µl Thioglycolsäure versetzt. Nach fünfmaligem kurzzeitigen Evakuieren und Füllen mit N_2 zum Entfernen von Sauerstoff wurde das Gefäß unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) zugeschmolzen. Die Hydrolyse erfolgte für 22 h bei 110 °C im Wärmeschrank.

Nach der Hydrolyse wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingedampft und anschließend in 2.0 ml Probenverdünnungspuffer (Na-Citrat-Puffer 0.2 M, pH 2.2) aufgenommen. Von dieser Lösung wurden mehrere Aliqote zur Bestimmung der Aminosäurezusammen-

setzung im Beckmann-Aminosäureanalysator Multichrom 4255 eingesetzt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines angeschlossenen Integrators. Als Referenz diente ein Eichgemisch bekannter Aminosäurezusammensetzung (2.5 mM/AS; Fa. Beckmann) Die Analyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. U. Löffler (Institut für Physiologische Chemie II) durchgeführt.

4.6. Bestimmung des Redoxpotentials E^o

Das Redopotential E^o von Ferredoxin aus *R. albus* wurde nach dem Verfahren von Tagawa und Arnon bestimmt (65). Dieses Verfahren beruht auf eine Gleichgewichtsreduktion von Ferredoxin in Gegenwart von Hydrogenase und Wasserstoff:

$$Fd_{ox}^{2+} + H_2 \xrightleftharpoons{\text{Hydrogenase}} Fd_{red} + 2\,H^+$$

Durch photometrische Messung des im Gleichgewicht vorliegenden Ferredoxin läßt sich das Redoxpotential E^o folgendermaßen errechnen:

$$K_{eq} = \frac{\left[H^+\right]^2 \left[Fd_{red}\right]}{\left[H_2\right] \left[Fd_{ox}\right]}$$

$$\Delta G^o = - R\,T \ln K_{eq} = -n\,F\,\Delta E^o = -n\,F\,(E^o_{Fd} - E^o_{H_2})$$

$$E^o_{Fd} - E^o_{H_2} = \frac{R\,T}{n\,F} \ln K_{eq} = 2.3 \frac{R\,T}{n\,F} \lg K_{eq}$$

$$E^{o}_{Fd} - E^{o}_{H_2} = 2.3\frac{R\,T}{n\,F}\lg\left[H^{+}\right]^2 - 2.3\frac{R\,T}{n\,F}\lg\left[H_2\right] + 2.3\frac{R\,T}{n\,F}\lg\frac{\left[Fd_{red}\right]}{\left[Fd_{ox}\right]}$$

Bei einem verwendeten H_2-Partialdruck von 1 atm vereinfacht sich die Gleichung zu

$$E^{o}_{Fd} = -2.3\frac{R\,T}{F}\,pH + 2.3\frac{R\,T}{n\,F}\lg\frac{\left[Fd_{red}\right]}{\left[Fd_{ox}\right]}$$

da unter diesen Bedingungen $E^{o}_{H_2} = 0$ und $-2.3\frac{R\,T}{n\,F}\lg\left[H_2\right] = 0$ sind. Das Redoxpotential E^{o}_{Fd} kann aus dieser Gleichung bei vorgegebenem pH durch Messung der Konzentration von reduziertem bzw. oxidiertem Ferredoxin in der Gleichgewichtslage bestimmt werden.

Die Messungen wurden bei 37°C in Glasküvetten mit Deckplatte und Schliff (d = 1 cm) durchgeführt. Die Küvetten enthielten 1 ml K-Phosphat-Puffer 100 mM pH 7. Nach dem Verschließen mit einem Weichgummistopfen wurden die Küvetten über eine Kanüle an der Wasserstrahlpumpe mehrfach evakuiert und mit Wasserstoff begast. Durch kräftiges Schütteln wurde die Flüssigphase (1 ml) mit der Gasphase (ca. 0.5 ml) äquilibriert. Zur Entfernung des Überdruckes aus den Küvetten wurden die Gummistopfen kurz mit einer Kanüle durchstochen. Der Wasserstoffpartialdruck entsprach dann dem atmosphärischen Außendruck von ca. 1 atm. Jetzt erfolgte die Zugabe von etwa 25 nmol oxidiertem Ferredoxin aus *R. albus* mit einer 25 µl-Spritze (Unimetrics, Fa.Macherey + Nagel, Düren). Durch Titration mit

Na-Dithionit wurde Ferredoxin reduziert. Vollständig reduziertes Ferredoxin zeigte 53 % der Extinktion von oxidiertem Ferredoxin bei λ_{405} (Abb. 23, S.77).

Die Reduktion von Ferredoxin wurde durch Messung der Extinktionsänderung bei λ_{405} im Gilford-Spectrophotometer 250 mit Schreiber verfolgt. Durch Zugabe von 2 µl hydrogenasehaltigem zellfreien Extrakt von *C. pasteurianum* wurde die Reaktion gestartet. Das Gleichgewicht hatte sich nach 5 min eingestellt. Aus dieser Gleichgewichtslage konnte die prozentuale Reduktion von Ferredoxin bestimmt werden, bezogen auf vollständig reduziertes Ferredoxin (Abb. 23, S.77).

Hydrogenase: Zur Gewinnung der Hydrogenase-Aktivität wurden 2 g Feuchtzellen von *C. pasteurianum* (Anzucht s. Schönheit, 56), 4 mg Lysozym und 0.4 mg DNase in 6 ml eiskaltem anaerobisiertem dest. Wasser suspendiert und bei 37 ^{o}C für 30 min anaerob unter H_2 inkubiert. Anschließend wurde der Aufschluß für 20 min abzentrifigiert (Tischzentrifuge Piccolo, max. Beschleunigung; Fa. Heraeus-Christ, Osterode) und der hydrogenasehaltige Überstand in ein Serumgläschen anaerob überführt. Der zellfreie Extrakt enthielt ca. 25 mg Protein pro ml und eine Hydrogenase-Aktivität von 5 µmol $min^{-1}mg^{-1}$. Er konnte ohne Aktivitätsverlust bei -20 ^{o}C aufbewahrt werden.

ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, daß am Energiestoffwechsel von *Ruminococcus albus* Ferredoxin als Elektronenüberträger beteiligt ist. Da Angaben über Eigenschaften dieses Eisen-Schwefel-Proteins für *R. albus* fehlten, diese jedoch für das Verständnis der Regulation von Bedeutung waren, folgt dem Abschnitt über die Regulation der Glucosefermentation ein Kapitel über die Charakterisierung von Ferredoxin aus *R. albus*.

1. Regulation der Glucosefermentation durch den H_2-Partialdruck

Ruminococcus albus fermentiert in Abhängigkeit vom herrschenden H_2-Partialdruck (pH_2) Glucose zu unterschiedlichen Produkten (26). Bei einem $pH_2 \leq 10^{-3}$ atm wird Glucose zu 2 Acetat, 2 CO_2 und 4 H_2 abgebaut (Gleichung 1). Ist der $pH_2 > 1$ atm, so werden 1 Acetat, 1 Äthanol, 2 CO_2 und 2 H_2 gebildet (Gl. 2).

1) $$Glc + 2\ H_2O \xrightarrow{pH_2 \leq 10^{-3}\ atm} 2\ Acetat + 2\ CO_2 + 4\ H_2$$

2) $$Glc + H_2O \xrightarrow{pH_2 > 1\ atm} Äthanol + Acetat + 2\ CO_2 + 2\ H_2$$

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde *R. albus* in batch-Kulturen auf einem Medium gezogen, das mit CO_2 gesättigt war. Gebildetes H_2 und CO_2 konnten ungehindert über eine Öffnung entweichen. Gasdruck und Atmosphärendruck standen daher im Gleichgewicht. Die sich ausbildende Gasatmosphäre setzte sich im Durchschnitt (über die ganze Kulturzeit gesehen) zusammen aus etwa 50% H_2 und 50 % CO_2. *Ruminococcus albus* wurde daher bei einem H_2-Partialdruck von pH_2 = 0.5 atm gezüchtet.

1.1. Fermentation von Glucose bei pH_2 = 0.5 atm

1.1.1 Fermentationsbilanz

Ruminococcus albus wuchs unter den gewählten Kulturbedingungen (Partialdruck von H_2 und CO_2 jeweils 0.5 atm) auf einem Glucose-Komplex-Medium über einen weiten Bereich logarithmisch mit einer Verdopplungszeit von t_d = 1.6 Stunden (Abb. 9). Gegen Ende des logarithmischen Wachstums hatte die Kultur eine Zelldichte von 0.38 g Trockengewicht je Liter. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden von den Zellen 375 µmol Glucose verbraucht, 472 µmol Acetat, 280 µmol Äthanol, 746 µmol CO_2 und 932 µmol H_2 gebildet (Tab. 1). Aus diesen Werten errechnet sich ein molarer Ertragskoeffizient für Glucose von Y_{Gluc} = 30 g mol^{-1}. Theoretisch zu erwarten sind pro mol gebildetes Acetat und pro mol gebildetes CO_2 jeweils 1 mol ATP, also insgesamt 3.25 mol ATP (69). Unter Zugrundelegung eines Energie-Ertragskoeffizienten von Y_{ATP} = 10 g mol^{-1} (21) sollten

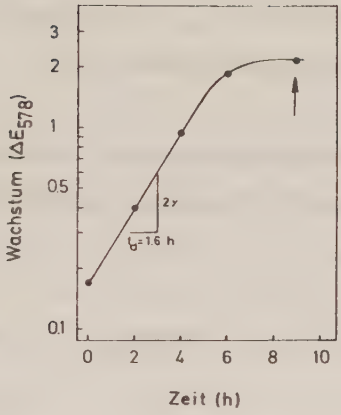


Abb. 9: Wachstum von *R. albus* unter einem H_2-Partialdruck von 0.5 atm. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in einem 50 ml-Serumgläschen mit 30 ml Glucose-Komplex-Medium (12.5 mM Glucose). Die Kultur wurde mit 1.5 ml einer gut wachsenden Vorkultur beimpft (= 5 % Inokulum).

Tabelle 1: Fermentationsbilanz von *Ruminococcus albus* nach 9 Stunden Wachstum auf Glucose (Abb.9).

Verbrauchte Menge	
Glucose	375 µmol
Gebildete Menge	
Acetat	472 µmol
Äthanol	280 µmol
CO_2	746 µmol*
H_2	932 µmol*
Zellausbeute (TG)	11.4 mg

*) berechnet aus dem Glucoseverbrauch und der gemessenen Bildung an Acetat und Äthanol

daher etwa 32,5 g Trockengewicht pro mol Glucose gebildet werden. Der gefundenen Wert von Y_{Gluc} = 30 g mol^{-1} stimmt daher gut mit dem errechneten Wert überein.

Aus der gefundenen Fermentationsbilanz geht hervor, daß bei $pH_2 \simeq$ 0.5 atm Glucose nach folgender Reaktionsgleichung umgesetzt wird:

3) 1 Glc + 1.25 H_2O ⟶ 1.25 Acetat + 0.75 Äthanol + 2 CO_2 + 2.5 H_2

Diese Fermentationsgleichung kann als Summe der beiden folgenden Reaktionsgleichungen aufgefaßt werden:

4) 0.75 Glc + 0.75 H_2O ⟶ 0.75 Acetat + 0.75 Äthanol + 1.5 CO_2 + 1.5 H_2

5) 0.25 Glc + 0.5 H_2O ⟶ 0.5 Acetat + 0.5 CO_2 + 1 H_2

Der Prozentsatz war über den gesamten Wachstumszeitraum weitgehend konstant und wurde von Versuch zu Versuch wiedergefunden. Der Anteil der Glucose, der zu 1 Acetat, 1 Äthanol, 2 CO_2 und 2 H_2 (Gl. 4), bzw. zu 2 Acetat, 2 CO_2 und 4 H_2 (Gl. 5) umgesetzt wird, scheint daher strikt reguliert zu werden. Die an der Produktbildung von Acetat und Äthanol beteiligten Enzyme müssen daher einer regulatorischen Kontrolle unterliegen.

1.1.2. An der Produktbildung beteiligte Enzyme

Aus dem gefundenen Wachsumtsertrag von Y_{Glc} = 30 g mol^{-1} geht hervor, daß *R.albus* Glucose über Reaktionen des Embden-Meyerhof-Weges fermentiert. Unter Verwendung des Entner-Doudoroff-Weges oder des Pentose-Phosphat-Weges (heterofermentativer Abbau der Milchsäurebakterien) dürfte der Ertrag 20 g mol^{-1} nicht übersteigen. Dieses Ergebnis wird gestützt durch den Befund, daß *R. albus* eine aktive Fructose-1,6-bis-phosphat-Aldolase bestitzt, nicht aber eine KDPG-Aldolase bzw. Phosphoketolase (29). In den vorliegenden Untersuchungen wurde gefunden, daß zellfreier Extrakt von *R. albus* über eine NAD-spezifische Glycerinalehydphosphat- Dehydrogenase, eine Ferredoxin-spez. Pyruvat-Dehydrogenase, eine NADH:Ferredoxin-

Tabelle 2: An der Glucosefermentation beteiligte Enzyme

Enzym	spez. Aktivität (µmol $min^{-1}_{mg}{}^{-1}$)	Coenzym-Spezifität	app. K_M (mM)
Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase	0.36	NAD	0.71 (NAD)
Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	1.2	Fd	0.5 (Pyr)
NADH:Ferredoxin Oxidoreduktase	0.035	NAD	n.g.
Ferredoxin-Hydrogenase	5.9	Fd	0.16 (H_2) 3.3 (MV)
Acetaldehyd-Dehydrogenase	1.4	NAD	0.03 (AcCoA) 0.05 (NADH)
Alkohol-Dehydrogenase	1.9	NAD	0.8 (AcH)
Phosphoglycerat-Kinase	2.1	-	n.g.
Phosphotransacetylase	4.9	-	n.g.
Acetat-Kinase	1.5	-	n.g.

Oxidoreduktase, eine Ferredoxin-Hydrogenase, eine NAD-spez. Acetaldehyd-Dehydrogenase (CoA-acylierend) und eine NAD-spez. Alkohol-Dehydrogenase verfügt. Ferner wurden eine Phosphoglycerat-Kinase, eine Phosphotransacetylase und eine Acetat-Kinase in hohen Aktivitäten nachgewiesen (Tab. 2). Aus der Fermentationsbilanz, dem Wachstumsertrag und den enzymatischen Befunden läßt sich das in Abb. 10 gezeigte Fermentationsschema für *R. albus* aufstellen.

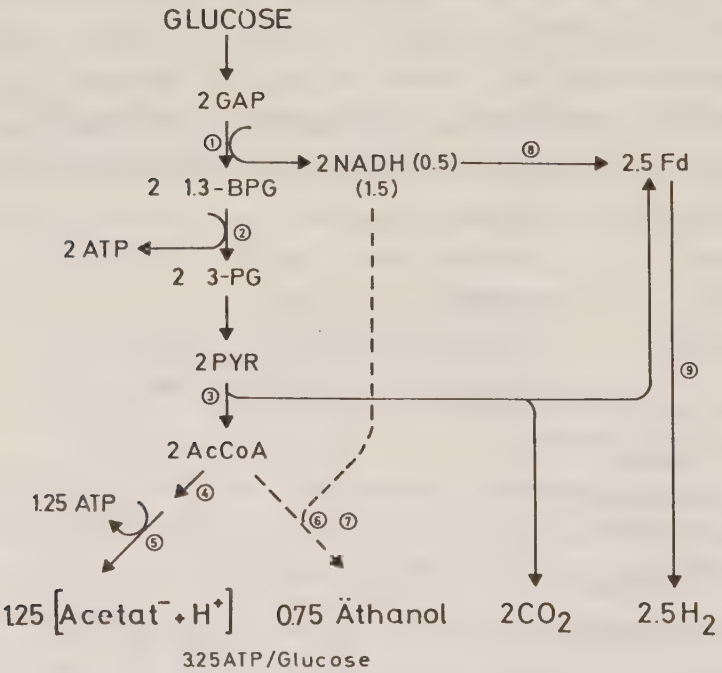


Abb. 10: Glucosefermentation von *Ruminococcus albus* bei einem H_2-Partialdruck von 0.5 atm. Das Schema stützt sich auf Fermentationsbilanzen, Wachstumsertragsmessungen und dem Nachweis der wichtigsten beteiligten Enzyme und Elektronenüberträger (s. Text).

Aus dem Reaktionsschema (Abb. 10) geht hervor, daß im oxidativen Teil des Energiestoffwechsels Glucose zu 2 Acetyl-CoA und 2 CO_2 umgesetzt wird. Dabei werden in der Glycerinaldelydphosphat-Dehydrogenase-Reaktion (Rkt. 1) die Elektronen auf NAD und in der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion (Rkt. 3) auf Ferredoxin übertragen. Oxidiertes Ferredoxin wird durch Reduktion von H^+ zu H_2 regeneriert (Rkt. 9). NADH wird teilweise durch Reduktion von Ferredoxin (Rkt. 8) und teilweise durch Reduktion von Acetyl-CoA zu Äthanol reoxidiert (Rkt. 6+7). Nichtreduziertes Acetyl-CoA wird über die Phosphotransacetylase-Reaktion (Rkt. 4) und die Acetatkinase-Reaktion (Rkt. 5) zu Acetat umgesetzt. ATP wird während der Fermentation in der Phosphoglycerat-Kinase-Reaktion (Rkt. 2) und in der Acetatkinase-Reaktion (Rkt. 5) regeneriert. Dabei werden pro mol Glucose im Embden-Meyerhof-Weg 2 mol ATP gebildet und pro mol produziertes Acetat zusätzlich 1 mol ATP. Unter den gegebenen Bedingungen wurden daher während der Fermentation 3.25 mol ATP pro mol Glucose gebildet.

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Dehydrogenase nehmen im Stoffwechselschema (Abb. 10) insofern eine Sonderstellung ein, als sie die beiden an der Fermentation beteiligten Oxidationsreaktionen katalysieren: In der Glycerinaledydphosphat-Dehydrogenase-Reaktion und der Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion werden Elektronenakzeptoren reduziert, die im reduzierten Teil des Energiestoffwechsels wieder reoxidiert werden müssen. Deshalb war die genaue Kennt-

nis der Coenzyme dieser beiden Enzyme wichtig. Die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase stellte sich als NAD-spezifisch heraus. Zellfreier Extrakt von *R. albus* katalysierte zwar sowohl die Reduktion von NAD als auch von NADP mit Glycerinaldehydphosphat in Gegenwart von Arsenat, der apparente V_{max}-Wert für NADH war jedoch 100 mal größer als der für NADP (Abb. 11). Das Enzym wurde durch das Produkt 1.3-bis-Phosphoglycerat stark gehemmt, weshalb die Aktivität in Gegenwart von Arsenat anstelle von Phosphat gemessen wurde (75). In den meisten Eigenschaften verhält sich die GAP-DH von *R. albus* also wie das Enzym in anderen saccharolytischen Anaerobiern

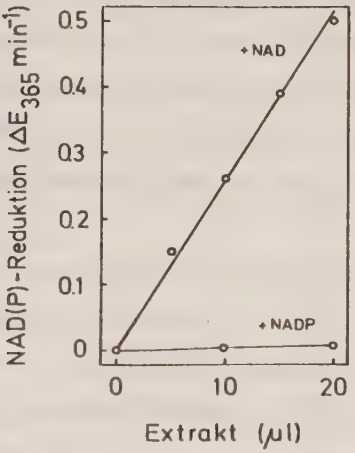


Abb. 11: Coenzym-Spezifität der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase von *R. albus*. Geschwindigkeit der Reduktion vonNAD bzw. NADP (0.6 mM) durch Glycerinaldehydphosphat in Abhängigkeit von der zugegebenen Extraktmenge (30 mg Protein pro ml). Genaue Bedingungen s. S. 22).

(32). Die Pyruvat-Dehydrogenase war spezifisch für Ferredoxin und katalysierte Pyruvat zu AcCoA und CO_2, was aus einer CoA-und Pyruvat-Abhängigkeit der Reduktion von Ferredoxin hervorging (Abb. 12). Extrakt von *R. albus* katalysierte weder die Reduktion von NAD noch von NADP mit Pyruvat unter den angegebenen Bedingungen. Das Enzym muß daher als eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase angesehen werden. Ähnlich wie das Enzym aus anderen anaeroben Bakterien (54) war die Pyruvat: Fd-Oxidoreduktase aus *R. albus* labil, extrem sauerstoffempfindlich, katalysierte einen schnellen Austausch zwischen CO_2 und der Carboxylgruppe von Pyruvat, katalysierte eine CoA-abhängige Reduktion von Viologen-Farbstoffen mit Pyruvat und wurde durch Acetyl-CoA in der Aktivität gehemmt.

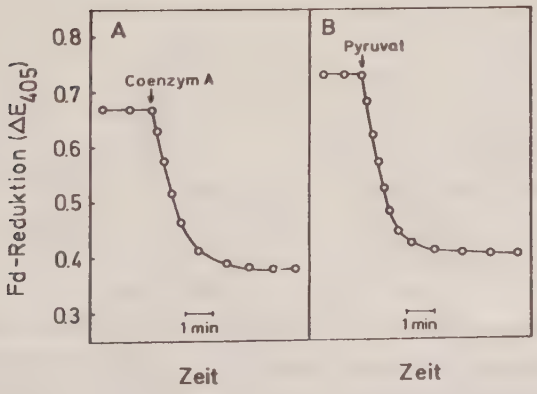


Abb. 12: Reduktion von Ferredoxin mit Pyruvat in zellfreien Extrakten von *R. albus*. Abhängigkeit von Coenzym A (50 µM) und Pyruvat (10 mM). Genaue Bedingungen s. S. 23.

Den beiden Oxidoreduktasen aus dem oxidativen Teil des Energiestoffwechsels stehen vier Reduktasen gegenüber, die an der Reoxidation von reduziertem Ferredoxin bzw. NADH beteiligt sind. Von diesen vier Reduktasen besaß die Hydrogenase die höchste spezifische Aktivität (s. Tab. 2). Das Enzym katalysierte die Reduktion von H^+ zu H_2 mit reduziertem Ferredoxin, nicht aber mit NADH oder NADPH. Viologen-Farbstoffe konnten Ferredoxin als Elektronenüberträger ersetzen. Die Hydrogenase war extrem sauerstoffempfindlich und wurde durch niedrige CO-Konzentrationen gehemmt, wobei die CO-Hemmung in Richtung der H_2-Aufnahme kompetetiv zu H_2 war (Abb. 13).

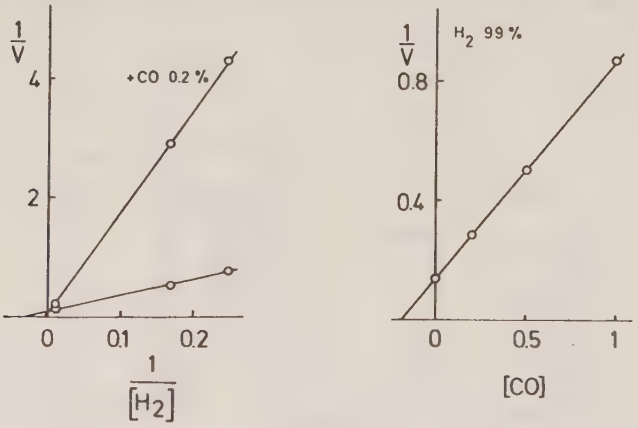


Abb. 13: Lineweaver-Burk-Plot der Reduktion von Methylviologen mit Wasserstoff durch zellfreien Extrakt von *R. albus* in Gegenwart und Abwesenheit von Kohlenmonoxid (0.2 % CO in der Gasphase). Genaue Bedingungen s.S.26.

Abb. 14: Reduktion von Methylviologen mit Wasserstoff in zellfreien Extrakten von *R. albus* in Gegenwart von verschiedenen Kohlenmonoxid-Konzentrationen. Die Auftragung erfolgte als Dixon-Plot (17). Genaue Bedingungen s.S. 26.

Im Dixon-Plot wurde bei Auftragung von 1/V gegen die Kohlenmonoxid-Konzentration eine Gerade erhalten, was zeigt, daß pro unabhängige Seite des Enzyms 1 Molekül CO gebunden wurde (Abb. 14). Unter Verwendung der Gleichung (78) $K = \frac{(K_m^*/K_m)-1}{[CO]}$ wurde ein K_i für CO von 0.03 % berechnet. Die Hydrogenase aus *R. albus* ist damit ähnlich dem Enzym aus anderen H_2-bildenden Anaerobiern (z.B. *C. pasteurianum*, 71). Die NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase konnte zunächst nur in Richtung der Reduktion von NAD mit reduziertem Ferredoxin nachgewiesen werden. Erst nachdem gefunden wurde, daß zur Reduktion von Ferredoxin mit NADH obligat AcCoA als Effektor notwendig ist, gelang ein Nachweis der Reduktion von Ferredoxin mit NAD (s.S.62). Der Nachweis

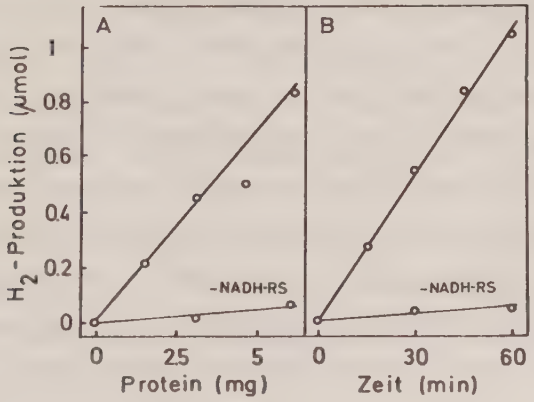


Abb. 15: Reduktion von Ferredoxin mit NADH in zellfreien Extrakten von *R. albus*. Gemessen wurde die Bildung von Wasserstoff mit Hydrogenase. Der 1 ml-Testansatz enthielt neben Extrakt sowohl ein AcCoA- als auch ein NADH-regenerierendes System. Im Versuch A wurde die Bildung von H_2 nach 40 min gemessen, im Versuch B enthielt der Testansatz 3 mg Protein. Genaue Bedingungen s. S.25.

erschwerte sich zusätzlich dadurch, daß zellfreier Extrakt eine schnelle Oxidation von NADH mit Acetyl-CoA katalysierte, wobei Acetyl-CoA zu Äthanol reduziert wurde. Es war deshalb notwendig, sowohl ein NADH-regenerierendes System als auch ein Acetyl-CoA-regenerierendes System dem Test zuzusetzen (s.S.25), um sowohl einen konstanten NADH-Spiegel als auch eine gleichbleibende Effektorkonzentration (Acetyl-CoA) aufrechtzuerhalten. Erst durch Zugabe beider regenerierender Systeme gelang es, sowohl eine lineare Zeit- als auch Protein-Abhängigkeit nachzuweisen (Abb. 15). Die NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase war extrem sauerstoffempfindlich und verlor auch unter anaeroben Bedingungen schnell an Aktivität. Eine gewisse Stabilisierung konnte erreicht werden durch Zugabe von zweiwertigen Ionen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} (2mM) nicht aber durch Ca^{2+}. Die gemessene spezifische Aktivität von 0.035 µmol min^{1-} mg^{1-} muß daher als unterer Wert angesehen werden. Die Acetaldehyd-Dehydrogenase katalysierte die Reduktion von AcCoA zu Acetaldehyd mit NADH. Reduziertes Ferredoxin und NADPH waren als Elektronendonatoren nicht wirksam, Acetat wurde nicht reduziert. Die gleiche Coenzym-Spezifität wurde auch für die Alkohol-Dehydrogenase gefunden. Zellfreier Extrakt von *R. albus* reduzierte Acetaldehyd zu Äthanol mit NADH, nicht aber mit NADPH.

Von den vier an der ATP-Bildung beteiligten Enzyme (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Phosphoglycerat-Kinase, Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase) zeigte nur die Phosphotransacetylase besondere Eigenschaften: Das Enzym war im Gegensatz zu bisher bekannten Phosphotransacetylasen extrem sauer-

stoffempfindlich. Die Aktivität konnte nur nachgewiesen werden unter aneroben Bedingungen mit Dithioerythrit (15) als Schutzreagenz für SH-Gruppen.

1.2. An der Regulation beteiligte katabole Schlüsselenzyme

Aus dem in Abb. 10 gezeigten Schema geht hervor, daß die Menge Acetyl-CoA, die über Acetylphospat zu Acetat umgewandelt bzw. über Acetaldehyd zu Äthanol reduziert wird, von der Menge NADH abhängt, die in der NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion verbraucht wird. Ist die NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase voll aktiv, so kann die gesamte Menge Acetyl-CoA zu Acetat umgesetzt werden. Ist dagegen das Enzym inaktiv, so muß NADH durch Reduktion von 50 % der vorhandenen Acetyl-CoA-Menge zu Äthanol reoxidiert werden, während die restlichen 50 % Acetyl-CoA weiterhin zu Acetat umgesetzt werden. Es läßt sich daher voraussagen, daß die Mengen Acetat bzw. Äthanol, die bei der Fermentation von Glucose gebildet werden, von der Aktivität der NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase abhängig sein sollten. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, daß die NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase ein regulatorisches Enzym ist, dessen Aktivität von der Acetyl-CoA-Konzentration in der Zelle abhängt. Es wird ferner gezeigt, daß der Acetyl-CoA-Spiegel in *R.albus* wahrscheinlich durch die Aktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase bestimmt wird, die über die Hydrogenase-Reaktion durch den H_2-Partialdruck gesteuert wird.

1.2.1. NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase

Zellfreier Extrakt von *Ruminococcus albus* katalysierte die Reduktion von Ferredoxin mit NADH nur in Gegenwart von Acetyl-CoA. Da Acetyl-CoA aufgrund der hohen Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase im Extrakt schnell zu Acetaldehyd reduziert wurde, mußte ein Acetyl-CoA-regenerierendes System, bestehend aus Acetylphosphat, Phosphotransacetylase und Coenzym A, dem Test zugesetzt werden, um eine lineare Zeit- und Proteinabhängigkeit der Reaktion zu erhalten (Abb. 16). In Abwesenheit von Acetylphosphat war die Aktivität des

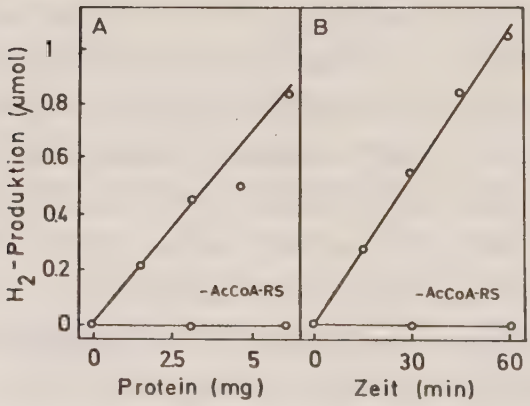


Abb. 16: Reduktion von Ferredoxin mit NADH in zellfreien Extrakten von *Ruminococcus albus*. Gemessen wurde die Bildung von Wasserstoff mit Hydrogenase. Der 1 ml-Testansatz enthielt neben Extrakt ein NADH- und ein Acetyl-CoA-Regenerierendes System. In Versuch A wurde die gebildete Menge Wasserstoff nach 40 min gemessen; der Versuch B enthielt 3 mg Protein pro ml Testansatz. Genaue Bedingungen s. S. 25.

Enzyms gleich Null. Wurde dem Testansatz zwar Acetylphosphat, aber kein Coenzym A zugesetzt, so wurde fast die volle Aktiität gefunden, was zunächst auf Acetylphosphat als Effektor hinwies. Wurde jedoch der zellfreie Extrakt zuvor mit Hilfe von Dowex-Acetat und Aktivkohle vollständig von Nucleotiden, insbesondere von Coenzym A befreit (s.S.21), so war die Reduktion von Ferredoxin mit NADH sowohl von Acetylphosphat als auch von Coenzym A abhängig. Dieser Befund zeigt eindeutig, daß Acetyl-CoA und nicht Acetlyphosphat oder Coenzym A der positive Effektor der NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase ist.

1.2.2 Acetyl-CoA umsetzende Enzyme

Die Acetyl-CoA-Konzentration in *R. albus* dürfte abhängig sein von der Geschwindigkeit der Bildung im Vergleich zur Geschwindigkeit des Verbrauchs von Acetyl-CoA. Acetyl-CoA wird allein in der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion gebildet, verbraucht wird Acetyl-CoA dagegen in der Acetaldehyd-Dehydrogenase-Reaktion und in der Phosphotransacetylase-Reaktion (Abb. 10, S.54).

Die Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase aus *R. albus* katalysierte die Reduktion von Ferredoxin mit Pyruvat. Aus Abb. 12 geht der zeitlich Verlauf dieser Reaktion hervor. Vor Start der Reaktion waren 100 % an Ferredoxin oxidiert, nach Ende der Reaktion 100 % reduziert. Trägt man die Geschwindigkeit der Ferredoxin-Reduktion in Abhängigkeit von dem Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten auf (Abb. 17), so wird deutlich, daß die Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase

bei hohem Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten stark gehemmt war. Die Zunahme der Hemmung war am ausgeprägtesten im Bereich des Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten von 0 bis 2, was wahrscheinlich der physiologische Bereich ist (s. Diskussion). Die Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat in *R. albus* dürfte daher stark vom Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten in der Zelle abhängig sein.

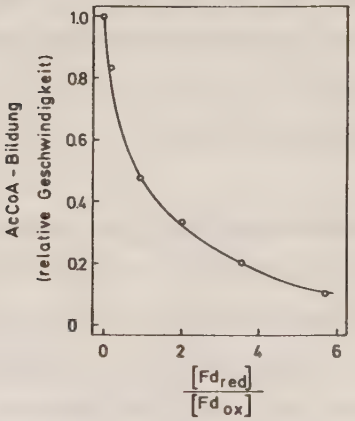


Abb. 17: Reduktion von Ferredoxin mit Pyruvat in zellfreien Extrakten von *Ruminococcus albus*. Abhängigkeit der Bildungsrate von Acetyl-CoA vom vorhandenen Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten, bezogen auf die Anfangsgeschwindigkeit (Fd zu 100 % oxidiert). Genaue Bedingungen s. S. 23.

Die Reduktion von Acetyl-CoA zu Acetaldehyd mit NADH wurde durch NAD gehemmt. Die beobachtete Hemmung von NAD war kompetetiv zu NADH (Abb. 18). Ein positiver oder negativer Einfluß von Effektoren wie Fd_{red}, Fd_{ox} oder Acetylphosphat auf die Aktivität der Acetaldehyd-Dehydrogenase wurde nicht beobachtet.

Die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetylphosphat in der Phosphotransacetylase-Reaktion wurde in *R. albus* weder durch NAD(H) noch durch Ferredoxin beeinflußt. Daraus wird geschlossen, daß dieses Enzym in *R. albus* im Gegensatz zur Phosphotransacetylase aus *Escherichia coli* (63) kein regulatorisches Enzym ist.

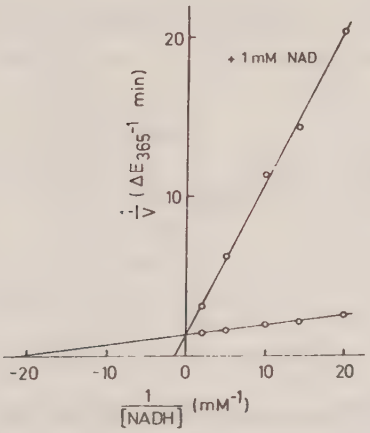


Abb. 18: Lineweaver-Burk-Plot der Reduktion von Acetyl-CoA mit NADH in Gegenwart und Abwesenheit von NAD. Der app. K_m-Wert für NADH in Gegenwart von 1 mM NAD betrug 0.7 mM. Genaue Bedingungen s.S. 28.

1.2.3. Ferredoxin-Hydrogenase

Aus der Bestimmung zur Enzymaktivität (Tab. 2 S.53) geht hervor, daß von den katabolen Enzymen die Hydrogenase das Enzym mit der höchsten spezifischen Aktivität in *R. albus* ist. Die Reduktion von Protonen sollte daher nicht der limitierende Schritt in der Fermentation von Glucose sein. Um dieses zu beweisen, wurde *R. albus* in Gegenwart und in Abwesenheit von Kohlenmonoxid wachsen gelassen und sowohl die Bildung von Wasserstoff als auch das Wachstum verfolgt (Abb. 19). Bei einer CO-Konzentration von 1 % in der Gasphase war die Hydrogenase von *R. albus* zu über 80 % gehemmt, was aus dem K_i-Wert der Hydrogenase für CO von 0.03 % hervorgeht (Abb. 13 S.58) Andere an der Fermentation beteiligte Enzyme

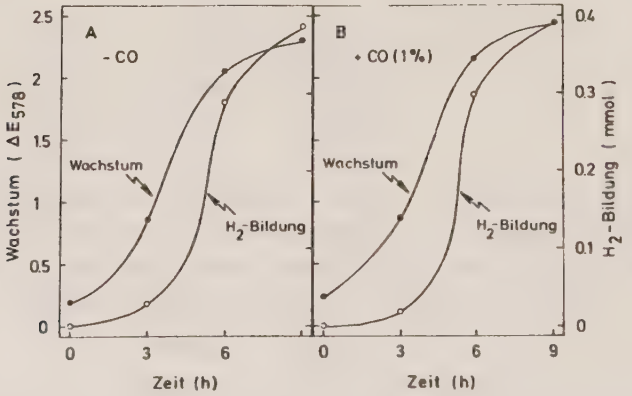


Abb. 19: Wachstum von *Ruminococcus albus* in Gegenwart und Abwesenheit von 1 % Kohlenmonoxid in der Gasphase. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in einem geschlossenen 50 ml-Serumgläschen mit 30 ml Glucose-Komplex-Medium (12,5 mM) auf einem Reziprokschüttler. Zur Bestimmung der Wasserstoffkonzentration wurden Proben von konstantem Volumen (0.15 ml) mit einer gasdichten Tuberkulinspritze (0.5 ml mit Absperrventil) entnommen und direkt zur Analyse eingesetzt.

wurden durch CO in ihrer Aktivität nicht gehemmt. Es wurde gefunden, daß CO bei der verwendeten Konzentration von 1 % weder einen Einfluß auf die Bildung von Wasserstoff und andere Fermentationsprodukte noch auf das Wachstum hatte (Abb. 19, Tab. 3). Die Hydrogenaseaktivität der unter CO gewachsenen Zellen war nur geringfügig erhöht. Diese Ergebnisse können nur erklärt werden, wenn in *R. albus* die Hydrogenase-Reaktion nahe am oder im Gleichgewicht operiert, worauf auch die hohe Aktivität der Hydrogenase in zellfreien Extrakten hinweist. Da - wie im Folgenden gezeigt wird - das Standard-Redoxpotential von Ferredoxin aus *R. albus* praktisch identisch ist mit dem des H^+/H_2-Paares (Abb. 23 S.77), muß bei einem niedrigen H_2-Partialdruck der Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotient niedrig und bei einem hohen H_2-Partialdruck hoch sein.

Tabelle 3: Bestimmung der Fermentationsprodukte Acetat und Äthanol nach 9-stündigem Wachstum von *Ruminococcus albus* in Gegenwart und Abwesenheit von 1 % CO in der Gasphase (Abb. 19).

	Kultur A - CO	Kultur B + CO
Verbrauchte Menge Glucose	375 µmol	375 µmol
Gebildete Menge		
Acetat	472 µmol	490 µmol
Äthanol	280 µmol	273 µmol
Hydrogenase-Aktivität ($\mu mol\ min^{-1} mg^{-1}$)	3.6	4.8

2. Reinigung und Charakterisierung von Ferredoxin aus *Ruminococcus albus*

Ferredoxin ist am Elektronentransport von NADH und Pyruvat zu Protonen beteiligt. In vorangegangenen Versuchen wurde nachgewiesen, daß die Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase durch den Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten reguliert wird und daß das Ferredoxin-System mit dem H^+/H_2-System über die Hydrogenase im Gleichgewicht steht. Um beurteilen zu können, wie sich der Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotient in der Zelle bei unterschiedlichem H_2-Partialdruck ändert, war es notwendig, das Redoxpotential E^o von Ferredoxin aus *R. albus* zu kennen. Da hierzu aus der Literatur keine Angaben vorlagen, mußte daher das Ferredoxin von *R. albus* gereinigt und die Redoxeigenschaften untersucht werden.

Im folgenden Teil wird zunächst das Reinigungsverfahren kurz diskutiert. Anschließend werden die Untersuchungen zum Molekulargewicht, zur Aminosäurezusammensetzung, zum molaren Extinktionskoeffizienten, zum Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel und zum Redoxpotential beschrieben.

2.1. Reinigung von Ferredoxin

Das hier angewandte Verfahren nach Schönheit (56) zur Isolierung von Ferredoxin umfaßt zum Teil unkonventionelle Schritte. Eine schematische Übersicht ist in der folgenden Abb. 20 wiedergegeben, genaue Angaben sind dem Materialteil zu entnehmen (s.S.34 ff.).

Das Aufbrechen der Zellwände und die Gewinnung von zellfreiem Extrakt unter Verwendung der French Press wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Ein Aufschluß mit Lysozym war nicht möglich, da die gram positiven Zellen weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von EDTA durch das Enzym lysiert wurden. Aus dem zellfreien Extrakt ($Ü_1$ in Abb. 20) ließ sich die Hauptmasse der Fremdproteine durch Acetonfällung (55 %) entfernen, während Ferredoxin mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht noch in Lösung blieb. Anschließend wurde Ferredoxin aus der Acetonlösung ($Ü_2$) spezifisch mit Polyäthylenimin ausgefällt, das mit Ferredoxin auf Grund der sauren Eigenschaft einen in Aceton schwerlöslichen Komplex bildet.

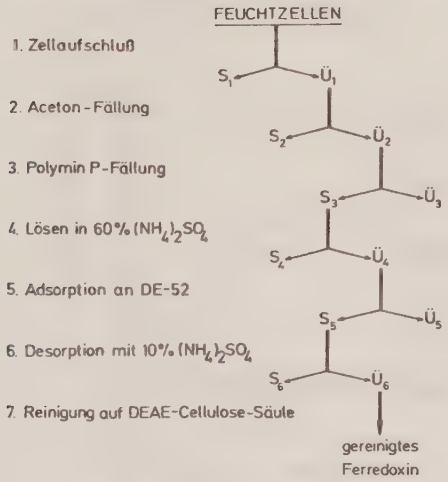


Abb. 20: Schema der Reinigung von Ferredoxin aus *R. albus*. Jedem Schritt schloß sich eine Zentrifugation an. S = Sediment, Ü = Überstand.

Nach Abzentrifugation wurde der Polyäthyleniminkomplex (S_3) in 60 % Ammoniumsulfat gelöst ($Ü_4$) und Ferredoxin an DEAE - Cellulose adsorbiert. Hier wurde die Eigenschaft von Ferredoxin ausgenutzt, sich bei sehr hoher Ionenstärke an DEAE-Cellulose zu binden. Nach gründlichem Waschen mit 60 % Ammoniumsulfat wurde die beladene DEAE-Cellulose (S_5) in 10 % Ammoniumsulfat suspendiert, wodurch Ferredoxin in Lösung ging. Zur Desorption wurde eine 10 % Ammoniumsulfatlösung verwendet, da Ferredoxin bei Ionenstärken niedriger als 10 % $(NH_4)_2SO_4$ wieder fest an DEAE-Cellulose bindet. Anschließend wurde gegen 90 % Ammoniumsulfat dialysiert. Unter diesen Bedingungen kristallisierte Ferredoxin aus. Das auskristallisierte Ferredoxin hatte einen $\Delta E_{390}/\Delta E_{280}$-Quotienten von 0.6. Da reine Ferredoxine einen $\Delta E_{390}/\Delta E_{280}$-Quotienten von 0.7

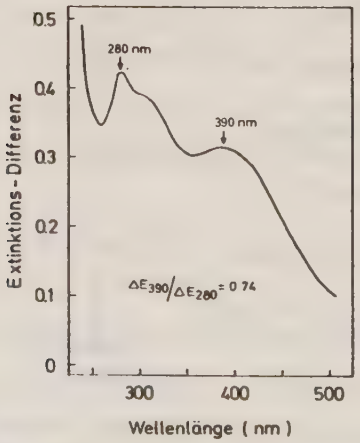


Abb. 21: Absorptionsspektrum von nachgereinigtem Ferredoxin aus *R. albus*.

haben, wurde das Ferredoxin einer Nachreinigung unterzogen, was durch erneute Adsorption an DEAE-Cellulose in 60 % Ammoniumsulfat mit anschließender Desorption bei abfallender $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration erreicht wurde. Das jetzt erhaltene Ferredoxin hatte einen hohen Reinheitsgrad mit einem $\Delta E_{390}/\Delta E_{280}$-Quotienten von 0.74. In der Abb. 21 ist das Absorptionsspektrum des hochgereinigten Ferredoxins aus *R. albus* wiedergegeben.

2.2. Molekulargewicht

Das Molekulargewicht für Ferredoxin wurde durch Gelfiltration an Sephadex G-50 ermittelt. Neben Chymotrypsinogen A (M_r = 28 000) und Myoglobin (M_r = 17 500) wurden Ferredoxine

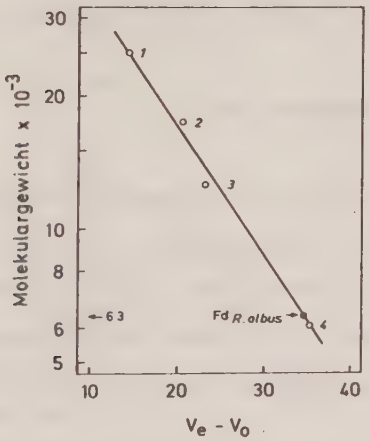


Abb. 22: Bestimmung des relativen Molekulargewichtes (M_r) von Ferredoxin aus *R. albus* durch Gelfiltration auf Sephadex G-50 (Abb. 8, s.S.44).
1.) = Chymotrypsinogen A, M_r = 26 000;
2.) = Myoglobin, M_r = 17 500;
3.) = Ferredoxin aus *Spinacia oleracea*, M_r = 12 500;
4.) = Ferredoxin aus *C. pasteurianum*, M_r = 6 000.

aus *Spinacia oleracea* (M_r = 12 500) und *Clostridium pasteurianum* (M_r = 6 000) als Eichproteine benutzt. Es war wichtig, das Molekulargewicht von Ferredoxin aus *R. albus* mit anderen Ferredoxinen als Vergleichsproteine zu bestimmen, da bekannt ist, daß Ferredoxin in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke ein unterschiedliches Elutionsverhalten an Molekularsieben zeigt (21,39).

Aus Abb. 22 ist zu entnehmen, daß Ferredoxin von *R. albus* etwa mit dem gleichen Volumen eluiert wird wie Ferredoxin aus *C. pasteurianum*, welches ein Molekulargewicht von 6 000 hat (68). Es muß daher angenommen werden, daß Ferredoxin aus *R. albus* und *C. pasteurianum* im Molekulargewicht ungefähr übereinstimmen. Aus der Abb. 22 wurde für Ferredoxin von *R. albus* ein genauer Wert von M_r = 6 300 ermittelt.

2.3. Aminosäurezusammensetzung

Zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung wurde hochgereinigtes Ferredoxin ($\Delta E_{390}/\Delta E_{280}$ = 0.74) mit 6 N HCl unter Sauerstoffausschluß hydrolysiert. Thioglycolsäure dient hierbei als Schutzreagenz für Tyrosin und Tryptophan (10, 44). Die eingesetzte Ferredoxinlösung hatte eine Extinktion von ΔE_{390} = 5.87.

Die gefundenen Aminosäurekonzentrationen sind in Tab. 4 Spalte 2 wiedergegeben. Ebenso wie im Ferredoxin von *C. pasteurianum* fehlen die Aminosäuren Histidin, Arginin und Tryptophan, was zusätzlich darauf hinweist, daß das isolierte

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung von Ferredoxin aus *R. albus*

1	2	3		4
Aminosäuren	$\frac{\mu mol\ AS}{ml}$	$\frac{mol\ AS}{mol\ Fd}$		ε_{390}
Lysin	0.415	1.8	2	28 300
Histidin	<0.06		0	
Arginin	<0.1		0	
Tryptophan	0		0	
Aspartat	1.255	5.4	5	23 400
Threonin	0.233	1.0	1	25 200
Serin	0.527	2.3	2	22 300
Glutamat	1.054	4.5	5	27 800
Prolin	1.103	4.7	5	26 600
Glycin	1.712	7.3	7	24 000
Alanin	2.294	9.8	10	25 600
Cystein/2	–		<8>	
Valin	0.606	2.6	3	29 100
Methionin	–		0*	
Isoleucin	0.805	3.5	4	29 200
Leucin	0.407	1.7	2	28 800
Tyrosin	0.294	1.4	1	20 000**
Phenylalanin	<0.07		0	
			Σ 55	$\bar{x}$ = 26 400 ± 2 500

*) In Analogie zu anderen Ferredoxinen wurde hier angenommen, daß Ferredoxin aus *Ruminococcus albus* kein Methionin enthält.

**)Dieser Wert wurde zur Bestimmung von ε_{390} nicht herangezogen.

Ferredoxin von *R. albus* rein ist. Unter der Annahme, daß die Aminosäure mit der niedrigsten Konzentration (Threonin) im Ferredoxin nur einmal vorkommt, wurde die Aminosäurezusammensetzung in Tab. 4 Spalte 3 berechnet. Die Berechnungen ergaben, daß Ferredoxin von *R. albus* aus 55 Aminosäuremolekülen aufgebaut ist. Ein Vergleich des Molekulargewichtes, berechnet aus der Aminosäurezusammensetzung (M_r = 6 300) und des durch Gelchromatographie ermittelten Molekulargewichtes von M_r = 6 300 zeigt, daß die Annahme korrekt ist, daß Threonin nur einmal im Ferredoxin von *R. albus* vorhanden ist.

Eine direkte Bestimmung des Cysteingehaltes erfolgte nicht, da Cystein bei der Hydrolyse in Gegenwart von Thioglycolsäure zerstört wird und die Folgeprodukte bei der Analyse der Aminosäuren nicht erfaßt wurden. Cystein konnte jedoch indirekt über den Gehalt an Eisen und säurelabilem Schwefel bestimmt werden. Es ist nämlich bekannt, daß Ferredoxine pro mol Fe^{2+} und S^{2-} ein Cystein enthalten (2, 53, 68, 72). Da pro mol Ferredoxin 8 mol Fe^{2+} und 8 mol S^{2-} gefunden wurden, ergibt das einen Cysteingehalt des Ferredoxins aus *R. albus* von 8 mol.

2.4. Molarer Extinktionskoeffizient ε_{390}

Der molare Extinktionskoeffizient ε_{390} für oxidiertes Ferredoxin wurde aus der Extinktion, gemessen bei λ_{390} und aus der Ferredoxin-Konzentration ermittelt. Eine Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode oder nach Lowry konnte nicht erfolgen, da Ferredoxin in diesen Tests pro mg Protein we-

sentlich höhere Werte ergibt, als z.B. Albumin (47). Daher wurde Ferredoxin nach Hydrolyse durch Messung der Aminosäurekonzentration mit einem Aminosäure-Analysator quantitativ erfaßt. Je nachdem, welche Aminosäure der Berechnung der Ferredoxin-Konzentration zugrunde gelegt wurde, lag der Wert für den molaren Extinktionskoeffizienten ε_{390} zwischen 22 000 und 33 000 $M^{-1}cm^{-1}$ (Tab. 4 Spalte 4) mit einem Mittelwert von ε_{390} = 26 400 $\pm$ 2 500 $M^{-1}cm^{-1}$. Es wird allgemein angenommen, daß Ferredoxine mit 8Fe und 8S (s.S.76) einen molaren Extinktionskoeffizienten von ε_{390} = 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$ besitzen (40). Bei der experimentellen Bestimmung wird dieser Wert jedoch fast nie erreicht, meistens wird ein Wert von ε_{390} = 26 000 $M^{-1}cm^{-1}$ erhalten (55). Es muß daher angenommen werden, daß auch Ferredoxin von *R. albus* mit einem Gehalt von 8Fe/8S je mol einen molaren Extinktionskoeffizient von ε_{390} = 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$ hat.

2.5. Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel

Der Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel von Ferredoxin aus *R. albus* wurde mit den im Material- und Methodenteil beschriebenen Verfahren bestimmt. Die beiden Methoden wurden mit Ferredoxin von *C. pasteurianum* überprüft und haben sich als zuverlässig herausgestellt (34).

Unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von ε_{390} = 26 400 $M^{-1}cm^{-1}$ wurde ein Eisen- und Schwefelgehalt von 7 mol pro mol Ferredoxin errechnet. Da Ferredoxine, sei es aus Pflanzen oder Bakterien, entweder 2, 4 oder 8 mol Fe/S (42) enthalten, muß angenommen werden, daß auch Ferredoxin aus *R. albus* 8 mol Nicht-Häm-Eisen und 8 mol säurelabilen Schwefel enthält. Ein Wert von 8 wird auch erhalten, wenn der Berechnung ein molarer Extinktionskoeffizient von ε_{390} = 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$ zugrunde gelegt wird (s.S. 75).

Tabelle 5: Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel von Ferredoxin aus *R. albus*

Zur Berechnung verwendeter ε_{390}-Wert	Gehalt pro mol Ferredoxin	
	Fe^{2+}	S^{2-}
26 400 $M^{-1}cm^{-1}$	7.0	7.2
30 000 $M^{-1}cm^{-1}$	7.9	8.1

2.6. Redoxpotential E^o

Die Bestimmung des Redoxpotentials E^o von Ferredoxin aus *R. albus* erfolgte bei pH 7.0 und 37 °C durch Gleichgewichtsreduktion mit Wasserstoff und Hydrogenase nach der Gleichung

$$E^o_{Fd} = -2.3 \frac{R\,T}{F}\,pH + 2.3 \frac{R\,T}{n\,F} \log \frac{[Fd_{red}]}{[Fd_{ox}]}$$

wobei R = 1.98 cal $mol^{-1}T^{-1}$; F 23 000 cal $V^{-1}mol^{-1}$; T = 310 K; und pH = 7.0 ist. In der Berechnung wurde n = 2 gesetzt, da bekannt ist, daß Ferredoxine mit 8 mol Eisen und 8 mol Schwefel 2 Elektronen übertragen (60, 62).

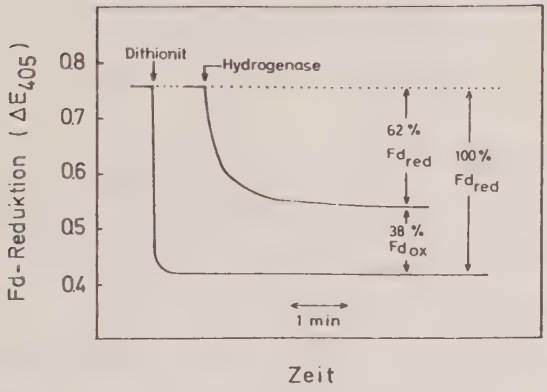


Abb. 23: Gleichgewichtsreduktion von Ferredoxin aus *R. albus* mit Wasserstoff und Hydrogenase bei 37 °C, 1 atm H_2 und pH 7. Genaue Bedingungen s. S. 46.

Die Gleichgewichtsreduktion wurde durch Zugabe von Hydrogenase (2 µl zellfreier Extrakt aus *C. pasteurianum*) gestartet und das Gleichgewicht von der oxidierten Seite eingestellt (Abb. 23). Die Abnahme der Extinktion bis zur Gleichgewichtslage wurde als Prozentsatz der Extinktionsabnahme bei maximaler Reduktion mit Dithionit angegeben. Tab. 6 zeigt die Meßergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen, die für die Berechnung von E^{o} benutzt wurden. Unter Verwendung des Mittelwertes wurde das Redoxpotential für Ferredoxin von *R. albus* mit $E^{o} = -422$ mV erhalten.

Tabelle 6: Bestimmung des Redoxpotentials E^{o} von Ferredoxin aus *R. albus* durch Gleichgewichtsreduktion mit Wasserstoff und Hydrogenase (s. Abb. 23)

% Ferredoxin im Gleichgewicht		E^{o} (mV)
Fd_{ox}	Fd_{red}	
43	57	-423
38	62	-421
42	58	-423
		$\bar{x} = -422$

DISKUSSION

1. Regulation der ATP-Ausbeute

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß Glucose in *Ruminococcus albus* über Reaktionen des Embden-Meierhof-Weges und die Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase-Reaktion zu Acetyl-CoA oxidiert wird (Abb. 25). Dabei werden pro mol Glucose 2 mol ATP bei der Oxidation von Glycerinaldehydphosphat zu 3-Phosphoglycerat gebildet. Acetyl-CoA wird entweder über Acetylphosphat unter Bildung eines weiteren ATP zu Acetat umgesetzt, oder unter Verbrauch von NADH ohne ATP-Bildung zu Äthanol reduziert. In der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Reaktion gebildetes NADH wird entweder durch Reduktion von Ferredoxin oder durch Reduktion von Acetyl-CoA reoxidiert. NADH und Acetyl-CoA stellen Verzweigungspunkte dar, die stöchiometrisch miteinander gekoppelt sind. Oxidiertes Ferredoxin wird durch Reduktion von Protonen regeneriert.

Von den beteiligten Enzymen scheinen Hydrogenase, Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase und NADH:Fd-Oxidoreduktase für die Regulation des Energiestoffwechsels durch den H_2-Partialdruck wichtig zu sein. Es wurde nachgewiesen, daß Hydrogenase in *R. albus* in sehr hohen Aktivitäten vorkommt. Daher muß angenommen werden, daß die Hydrogenase-Reaktion im Gleichgewicht ist, was auch durch CO-Hemmversuche bestätigt werden konnte (s.S.66). Es wurde gezeigt, daß das Redoxpotential des Fd_{ox}/Fd_{red}-Paares (s.S. 78) mit dem des H^+/H_2-Paares praktisch

identisch ist. Das hat zur Folge, daß bei einem H_2-Partialdruck von 1 atm etwa 50 % des Ferredoxins in der reduzierten Form und 50 % in der oxidierten Form in der Zelle vorliegen müssen. Bei einem H_2-Partialdruck von 10^{-3} atm sollte dagegen nur 0.1 % Ferredoxin in der reduzierten Form vorliegen. Untersuchungen zur Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase haben ergeben, daß dieses Enzym stark durch reduziertes Ferredoxin gehemmt wird, wobei das Verhältnis von reduziertem Ferredoxin zu oxidiertem Ferredoxin und nicht die absolute Konzentration von reduziertem Ferredoxin für die Aktivität ausschlaggebend ist (Abb. 24). Die Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase sollte daher bei hohem H_2-Partialdruck relativ inaktiv und bei niedrigem H_2-Partialdruck aktiv sein, wobei im physiologischen Bereich

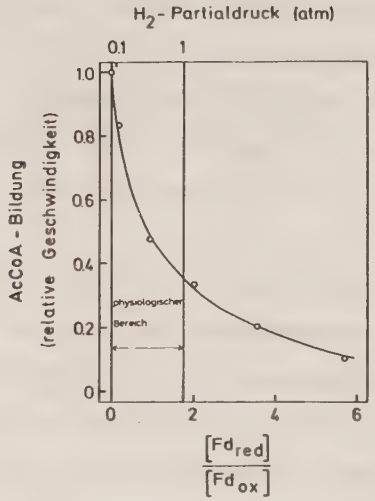


Abb. 24: Reduktion von Ferredoxin mit Pyruvat in zellfreien Extrakten von *Ruminococcus albus*. Abhängigkeit der Acetyl-CoA Bildungsrate vom vorhandenen H_2-Partialdruck. Die obere Abszisse gibt den H_2-Partialdruck wieder, der mit dem Fd_{red}/Fd_{ox}-Quotienten über die Hydrogenase-Reaktion im Gleichgewicht steht (E^o für Ferredoxin aus *R. albus* = -422 mV bei 37 °C).

die stärkste Änderung der Aktivität zu erwarten ist. Als Folge dürfte bei hohem pH_2 die Acetyl-CoA-Konzentration in der Zelle niedriger sein als bei niedrigem pH_2, da die Bildungsrate von Acetyl-CoA von der Aktivität der Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase abhängig ist.

Es wurde gefunden, daß Acetyl-CoA die Aktivität der NADH:Fd-Oxidoreduktase beeinflußt. Das Enzym benötigt Acetyl-CoA als obligaten Effektor, wobei Coenzym A antagonistisch zu Acetyl-CoA wirkt (30). Es läßt sich daher voraussagen, daß über die Hydrogenase-Reaktion und die Pyruvat-Fd-Oxidoreduktase-Reaktion die NADH:Fd-Oxidoreduktase durch den

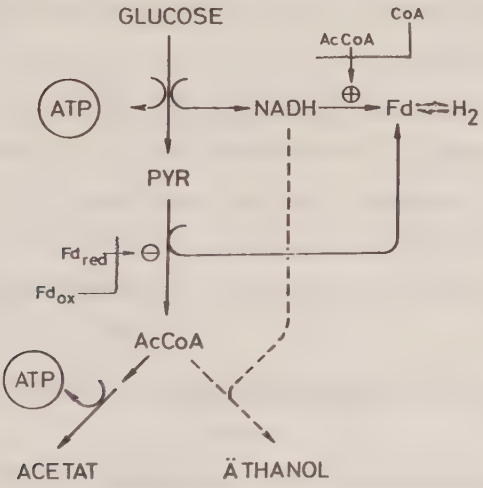


Abb. 25: Schema der Regulation des Energiestoffwechsels von *Ruminococcus albus*.

H_2-Partialdruck beeinflußt wird, und zwar so, daß bei hohem pH_2 das Enzym inaktiv ist und bei niedrigem pH_2 aktiv. Bei aktiver NADH:Fd-Oxidoreduktase wird alles Acetyl-CoA über Acetylphosphat in Acetat umgewandelt und damit zur Bildung von ATP bereit gestellt. Bei inaktiver NADH: Fd-Oxidoreduktase werden 50 % vom Acetyl-CoA zu Äthanol reduziert und gehen somit für die ATP-Bildung verloren. Durch die Regeleigenschaften der NADH:Fd- und der Pyruvat:Fd-Oxidoreduktasen kann somit befriedigend erklärt werden, wie es zu einer Regulation der Produktbildung und damit der ATP-Ausbeute durch den H_2-Partialdruck kommt.

Die NADH:Fd-Oxidoreduktase aus Clostridien ist ebenfalls ein regulatorisches Enzym, das durch Acetyl-CoA obligat aktiviert wird (30, 31, 32, 50, 51, 70). Auch Clostridien ändern bei der Fermentation von Kohlenhydraten ihre Produktzusammensetzung in Abhängigkeit vom H_2-Partialdruck (14). Es ist daher zu vermuten, daß die Regulation des Energiestoffwechsels in Clostridien über den gleichen Reaktionsmechanismus erfolgt wie für *Ruminococcus albus* gefunden wurde.

2. Regulation des Thermodynamischen Wirkungsgrades

Der thermodynamische Wirkungsgrad (η) der Umsetzung von Substraten (S) zu Produkten (P) im Energiestoffwechsel ist definiert (69) als

$$\eta = \frac{n \times \Delta G \quad (ATP \longrightarrow ADP + P_a)}{\Delta G \quad (S \longrightarrow P)} \times 100\ \%$$

wobei n die Anzahl der gebildeten Mole ATP and ΔG die Änderung der freien Energie unter physiologischen Bedingungen ist. ΔG der ATP-Hydrolyse beträgt in anaeroben Bakterien etwa - 43,9 kJ mol^{-1} (69). Der Wert für ΔG der Umsetzung von Glucose wurde aus den freien Bildungsenthalpien der beteiligten Substrate und Produkte unter Berücksichtigung der Konzentrationsabhängigkeit von ΔG berechnet. Es zeigte sich, daß bei niedrigem H_2-Partialdruck die Fermentation von Glucose exergoner verläuft als bei hohem pH_2.

pH_2: 0.5 ATM

$$1\ \text{GLC} + 1.3\ H_2O \xrightarrow{3.3\ \text{ATP}} 0.7\ \text{ÄTHANOL} + 1.3\ \text{ACETAT}^- + 1.3\ H^+ + 2\ CO_2 + 2.6\ H_2$$

$\Delta G' = -226{,}9$ kJ mol^{-1} *

$\eta = 63{,}8\ \%$

pH_2: 10^{-3} ATM

$$1\ \text{GLC} + 2\ H_2O \xrightarrow{4\ \text{ATP}} 2\ \text{ACETAT}^- + 2\ H^+ + 2\ CO_2 + 4\ H_2$$

$\Delta G' = -272{,}6$ kJ mol^{-1} **

$\eta = 64{,}4\ \%$

*) berechnet für Glucose, Acetat und Äthanol = 10^{-2} M; pH 7; CO_2 = 0.5 atm.

**) berechnet für Glucose und Acetat = 10^{-2} M; pH 7; CO_2 = 1 atm.

Der thermodynamische Wirkungsgrad bleibt dabei jedoch annähernd konstant. Er liegt bei 64 %. Dies ist im Vergleich zu anderen anaeroben Bakterien ein relativ hoher Wert und scheint eine obere Grenze darzustellen. Der Wirkungsgrad des Energiestoffwechsels muß nämlich beträchtlich unter 100 % liegen, damit die Synthese von ATP aus ADP und P_a irreversibel erfolgt (16). Es scheint, daß es *Ruminococcus albus* über die beschriebenen Regelmechanismen möglich ist, den thermodynamischen Wirkungsgrad konstant hoch zu halten. Damit wird es diesen Bakterien möglich, die ATP-Ausbeute im Energiestoffwechsel zu erhöhen, wenn - wie zum Beispiel bei niedrigem H_2-Partialdruck - die Umsetzung von Substraten exergoner verläuft.

3. Eigenschaften von Ferredoxin aus *Ruminococcus albus*

Es wurde gefunden, daß *R. albus* 8 mol Nicht-Häm-Eisen und 8 mol säurelabilen Schwefel bei einem Molekulargewicht von 6 000 enthält. Ferredoxine mit dieser Zusammensetzung (8Fe/8S) und diesem Molekulargewicht wurden bisher gefunden in den meisten Clostridien (5, 43, 53, 66, 67, 68 ; mit Ausnahme von *C. thermoaceticum* mit 4Fe/4S pro mol, 81), in *Peptococcus aerogenes* (72; frühere Bez.: *Micrococcus aerogenes*, 6), in *Megasphaera elsdenii* (3; frühere Bez.: *Peptostreptococcus aerogenes*, 6) und in *Veillonella alcalescens* (4; frühere Bez.: *Micrococcus lactylyticus*, 6). All diesen Bakterien ist gemeinsam, daß sie obligat anaerobe Organismen sind. In Tabelle 7 ist die Aminosäurezusammensetzung von Ferredoxin aus den obengenannten Bakte-

Tabelle 7: Übersicht über Aminosäurezusammensetzung und Eigenschaften von Ferredoxin aus *Ruminococcus albus* und anderen 8Fe/8S-Ferredoxinen aus verschiedenen anaeroben Bakterien.

	C. PASTEURIANUM	C. BUTYRICUM	C. ACIDIURICI	C. THERMOSACCHAROLYTICUM	C. TARTARIVORUM	PEPTOCOCCUS AEROGENES	MEGASPHAERA ELSDENII	RUMINOCOCCUS ALBUS
	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	
LYSIN	1	0	0	0	2	1	2	2
HISTIDIN	0	0	0	2	2	0	1	0
ARGININ	0	0	1	0	0	0	0	0
TRYPTOPHAN	0	0	0	0	0	0	0	0
ASPARTAT	8	9	8	4	4	8	3	5
THREONIN	1	3	1	4	4	0	5	1
SERIN	5	3	3	1	1	5	4	2
GLUTAMAT	4	5	4	7	7	4	6	5
PROLIN	3	3	4	2	2	5	2	5
GLYCIN	4	5	4	5	5	4	5	7
ALANIN	8	7	9	10	10	7	7	10
CYSTIN/2	8	8	8	8	8	8	8	8
VALIN	6	6	6	4	4	4	5	3
METHIONIN	0	0	0	0	0	0	1	0
ISOLEUCIN	5	4	5	5	5	6	4	4
LEUCIN	0	0	0	0	0	0	0	2
TYROSIN	1	0	2	1	1	2	1	1
PHENYLALANIN	1	2	0	0	0	0	0	0
$\sum$ AS	55	55	55	55	55	54	54	55
M_R	6000[h]		6000[i]					6300
MOL Fe/S	8[h]		8[i]		8[k]	8[l]		8
$E^{0'}$	-410[m] -403[n] -397[o]		-434[n,p] -418[p]		-424[n]	-427[n]		-422
N	2[o]		2[n]		2[n]	2[n]		2
ε_{390}	30 000[h]		30 600[i]					30 000

a) Tanaka et al. (68); b) Benson et al. (5); c) Rall et al. (53); d) Tanaka et al. (67); e) Tanaka et al. (66); f) Tsunoda und Yasunobu (72); g) Azari (3); h) Lovenberg et al. (40); i) Hong und Rabinowitz (23); k) Mathews et al. (43); l) Adman et al. (2); m) Tagawa und Arnon (64); n) Stombaugh et al. (62); o) Sobel und Lovenberg (60); p) Lode et al. (39).

rien der von *R. albus* gegenübergestellt. Ferredoxin aus *R. albus* ähnelt den meisten 6 000 dalton-Ferredoxinen mit 8Fe/8S darin, daß es kein Histidin, Arginin, Tryptophan, Phenylalanin und Methionin enthält. Dafür enthält es jedoch 2 mol Leucin, eine Aminosäure, die in allen bisher untersuchten 8Fe/8S Ferredoxinen zu fehlen scheint. Dies hat jedoch weder eine Auswirkung auf das Redoxpotential noch den molaren Extinktionskoeffizienten, wie aus einem Vergleich mit den anderen Ferredoxinen hervorgeht (Tab. 7).

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abiko, Y., Suzuki, T., Shimizu, M., (1967): Investigation on pantothenic acid and its related compounds. VI. Biochemical studies (2). Determination of Coenzyme A by the phosphotransacetylase system of *Escherichia coli B*. J. Biochem. 61, 10-17.

2. Adman, E.T., Sieker, L.C., Jensen, L.H. (1973): The structure of bacterial ferredoxin. J. Biol. Chem. 248, 3987-3996.

3. Azari, P., Tsunoda, J., Glantz, M., Mayhew, S., Yasunobu, K.T. (1970): unveröffentlicht, zitiert nach: Yasunobu,K.T., Tanaka, M. (1973): The types, distribution in nature , structure-function, and evolutionary data of the iron-sulfur proteins. In: Iron-sulfur proteins, Vol. II, 27-130. Hrg.: Lovenberg, W. Academic Press, New York.

4. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E., Pfleiderer, G. (1953): Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerolphosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskelatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555-577.

5. Benson, A.M., Mower, H.F., Yasunobu, K.T. (1967): The amino acid sequence of *Clostridium butyricum* ferredoxin. Arch. Biochem. Biophys. 121, 563-575.

6. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8. ed. 1974. Hrg.: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. Williams & Wilkins, Baltimore.

7. Bergmeyer, H.U., Bernt, E. (1970): Bestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase. In: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl. Band 2, 1172-1181. Hrg.: Bergmeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim.

8. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Graßl, M. (1970): I. Enzyme. In: Methoden der enzymatischen Analysen. 2. Aufl. Bd. I, 388-483. Hrg.: Bergmeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim.

9. Bernt, E., Gutman, I. (1970): Äthanol. Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl. Band 2, 1457-1460. Hrg.: Bergmeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim.

10. Blackburn, S. (1968): Amino acid determination. Methods and techniques. Hrg.: Dekker, New York.

11. Bryant, M.P., Small, N., Bouma, C., Robinson, I.M. (1958): Characteristics of ruminal anaerobic cellulolytic cocci and *Cillobacterium cellulosolvens* n. sp. J. Bacteriol. 76, 529-537.

12. Bryant, M.P., Wolin, M.J. (1975): Rumen bacteria and their metabolic interactions. In: First International Congress, Int. Assoc. Microbiol. Soc. Vol. II. University of Tokyo Press.

13. Chen, M., Wolin, M.J. (1977): Influence of CH_4 production by *Methanobacterium ruminantium* on the fermentation of glucose and lactate by *Selenomonas ruminantium*. App. Environ. Microbiol. 34, 756-759.

14. Chung, K.T. (1976): Inhibitory effects of H_2 on growth of *Clostridium cellobioparum*. Appl. Environ. Microbiol. 31, 342-348.

15. Cleland, W.W. (1964): Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. Biochemistry, 3, 480-482.

16. Decker, K., Jungermann, K., Thauer, R.K. (1970): Energy production in anaerobic organisms. Angew. Chem. Int. Ed. 9, 138-158.

17. Dixon. M., Webb, E.C. (1959). Nature, 184, 1298.

18. Doeg, K.A., Ziegler, D.M. (1962): Simplified methods for the estimation of iron in mitochondria and submitochondrial fractions. Arch. Biochem. Biophys. 97, 37-40.

19. Ehhalt, D.H. (1976): The cycle of atmospheric trace gases. In: Microbial production and utilization of gases. 13-22. Hrg.: Schlegel, H.G., Gottschalk, G., Pfennig, N. Goltze KG, Göttingen.

20. Fogo, J.K., Popowsky, M. (1949): Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. Anal. Chem. 21, 732-734.

21. Gersonde, K., Trittelwitz, E., Schlaak, H.D., Stabel, H.H. (1971): The influence of the dimerisation on the stoichiometry of the active center in ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Eur. J. Biochem. 22, 57-65.

22. Glass, T.L., Bryant, M.P., Wolin, M.J. (1977): Partial purification of ferredoxin from *Ruminococcus albus* and its role in pyruvate metabolism and reduction of nicotinamide adenine dinucleotide by H_2. J. Bacteriol. 131, 463-472.

23. Hong, J.S., Rabinowitz, J.C. (1970): Molar extinction coefficient and iron sulfide content of clostridial ferredoxin. J. Biol. Chem. 245, 4982-4994.

24. Hungate, R.E. (1966): The rumen and its microbes. Academic Press, New York and London.

25. Hungate, R.E. (1967): Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. Arch. Microbiol. 59, 158-164.

26. Iannotti, E.L., Kafkewitz, D., Wolin, M.J., Bryant, M.P. (1973): Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: Changes caused by interspecies transfer of H_2. J. Bacteriol. 114, 1231-1240.

27. Jander, G., Jahr, K.F., Knoll, H. (1966): Maßanalyse. Sammlung Göschen, Bd. 221/221a. Walter de Gruyter, Berlin.

28. Jones, K.M. (1968): Artificial substrates and biochemical reagents. In: Data for biochemical research. 2nd. ed. 436-473. Hrg.: Dawson, R.M., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M. Clarendon Press, Oxford.

29. Joyner, A.E.jr., Baldwin, R.L. (1966): Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganisms. J. Bacteriol. 92, 1321-1330.

30. Jungermann, K., Kern, M., Riebeling, V., Thauer, R.K. (1976): Function and regulation of ferredoxin reduction with NADH in clostridia. In.: Microbial production and utilization of gases. 85-96. Hrg.: Schlegel, H.G., Gottschalk, G., Pfennig, N. Goltze KG, Göttingen.

31. Jungermann, K., Rupprecht, E., Ohrloff, C., Thauer, R.K., Decker, K. (1971): Regulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide - ferredoxin reductase system in *Clostridium kluyveri*. J. Biol. Chem. 246, 960-963.

32. Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., Decker, K. (1973): Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. Biochim. Biophys. Acta, 305, 268-280.

33. Katz, N. (1972): Die Reduktion von Triphenyltetrazoliumchlorid: Eine spezifische Indikatorreaktion zur Messung der NADH-Ferredoxin-Oxidoreduktase und weiterer Ferredoxin-Reduktasen. Diplomarbeit, Universität Freiburg.

34. King, T.E., Morris, R.O. (1967): Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. In: Methods in Enzymology, 10, 634-641. Hrg.: Estabrook, R.W., Pullman, M.E. Academic Press, New York.

35. Koch, O.G., Koch-Dedic, G.A. (1974): Handbuch der Spurenanalyse. 2. Aufl. Teil 1. Springer Verlag, Berlin.

36. Kyryakos, G., Boord, C.E. (1957): Separation of hydrogen, oxygen, nitrogen, methane and carbon monoxide by gas adsorption chromatographyy. Anal. Chem. 29, 787-788.

37. Latham, M.J., Wolin, M.J. (1977): Fermentation of cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium ruminanantium*. Appl. Environ. Microbiol. 34, 297-301.

38. Lipman, F., Tuttle, L.C. (1945): A specific micromethod for determination of acyl phosphates. J. Biol. Chem. 159, 21-28.

39. Lode, E.T., Murray, C.L., Rabinowitz, J.C. (1976): Apparent oxidation-reduction potential of *Clostridium acidiurici* ferredoxin. J. Biol. Chem. 251, 1683-1687.

40. Lovenberg, W., Buchanan, B.B., Rabinowitz, J.C. (1963): Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. J. Biol. Chem. 238, 3899-3913.

41. Mah, R.A., Ward, D.M., Baresi, L., Glass, T.L. (1977): Biogenesis of methane. Ann. Rev. Microbiol. 31, 309-341.

42. Malkin, R. (1973): The chemical properties of ferredoxins. In: Iron-sulfur proteins, Vol. II, 1-26. Hrg.: Lovenberg, W. Academic Press, New York.

43. Mathews, R., Charlton, S., Sands, R.H., Palmer, G. (1974): On the nature of spin coupling between the iron-sulfur clusters in eight-iron ferredoxins. J. Biol. Chem. 249, 4326-4328.

44. Matsubara, H., Sasaki, R.M. (1969): High recovery of tryptophane from acid hydrolysates of proteins. Biochem. Biophys. Res. Com. 35, 175-181.

45. Miller, T.L., Wolin, M.J. (1973): Formation of hydrogen and formate by *Ruminococcus albus*. J. Bacteriol. 116, 836-846.

46. Miller, T.L., Wolin, M.J. (1974): A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivation obligate anaerobes. Appl. Microbiol. 27, 985-987.

47. Mortenson, L.E. (1964): Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta, 81, 71-77.

48. Netheler, H. (1970): Absorptionsphotometrie. In: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl. Bd. 1, 145-168. Hrg.: Bergmeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim.

49. Packer, E.L., Sternlicht, H. (1975): The calculation of midpoint oxidation-reduction potentials of clostridial-type ferredoxins. J. Biol. Chem. 250, 2072.

50. Petitdemange, H., Cherrier, C., Bengone, J.M., Gay, R. (1977): Study of NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductase activity in *Clostridium acetobutylicum*. Can. J. Microbiol. 23, 152-160.

51. Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G., Gay, R. (1976): Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin-oxidoreductases in clostridia of the butyric group. Biochim. Biophys. Acta, 421, 334-347.

52. Petitdemange, H., Marczak, R., Gay, R. (1979): NADH:Flavodoxin oxidoreductase activity in *Clostridium tyrobutyricum*. FEMS Microbiol. Letters, 5, 291-294.

53. Rall, S.C., Bolinger, R.E., Cole, R.D. (1969): The amino acid sequence of ferredoxin from *Clostridium acidiurici*. Biochemistry, 8, 2486-2496.

54. Sauer, F.D., Bush, R.S., Stevenson, I.L. (1976): The separation of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium pasteurianum* into two enzymes catalyzing different reactions. Biochim. Biophys. Acta, 445, 518-520.

55. Scheifinger, C.C., Linehan, B., Wolin, M.J. (1975): H_2 production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methanogenic bacteria. Appl. Microbiol. 29, 480-483.

56. Schönheit, P., Wäscher, C. Thauer, R.K. (1978): A rapid procedure for the purification of ferredoxin from clostridia using polyethylenimine. FEBS Letters, 89, 219-222.

57. Schymanski, W. (1976): Charakterisierung von mit Polyäthyleniminen präparierten Ferredoxinen. Staatsexamensarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

58. Shimizu, M., Suzuki, T., Kameda, K., Abiko, Y. (1969): Phosphotransacetylase of *Escherichia coli B*, purification and properties. Biochim. Biophys. Acta, 191, 550-558.

59. Sieker, L.C., Adam, E., Jensen, L.H. (1972): Structure of the Fe-S complex in a bacterial ferredoxin. Nature, 235, 40-42.

60. Sobel, B.E., Lovenberg, W. (1966): Characteristics of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. Biochemistry, 5, 6-13.

61. Stadtman, E.R., Novelli, G.D., Lipman, F. (1951): Coenzyme A function in and acetyl transfer by the phosphotransacetylase system. J. Biol. Chem. 191, 365-376.

62. Stombaugh, N.A., Burris, R.H., Orme-Johnson, W.H. (1974): Oxidation-reduction potential of ferredoxins and methylviologen. Fed. Proc. 33, 1255.

63. Suzuki, T. (1969): Phosphotransacetylase of *Eschericichia coli B*, activation by pyruvate and inhibition by NADH and certain nucleotides. Biochim. Biophys. Acta, 191, 559-569.

64. Tagawa, K., Arnon, D.I. (1962): Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas. Nature, 195, 537-543.

65. Tagawa, K., Arnon, D.I. (1968): Oxidation-reduction potentials and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins. Biochim. Biophys. Acta, 153, 602-613.

66. Tanaka, M., Haniu, M., Matsueda, G., Yasunobu, K.T. (1971): The primary structure of the *Clostridium tartarivorum* ferredoxin, a heat-stable ferredoxin. J. Biol. Chem. 246, 3953-3960.

67. Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K.T. (1973): The primary structure of the *Clostridium thermosaccharolyticum* ferredoxin, a heat-stable ferredoxin. J.Biol. Chem. 248, 5215-5217.

68. Tanaka, M., Nakashima, T., Benson, A., Mower, H., Yasunobu, K.T. (1966): The amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. Biochemistry, 5, 1666-1681.

69. Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. (1977): Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bact. Rev. 41, 100-180.

70. Thauer, R.K., Jungerman, K., Rupprecht, E., Decker, K. (1969): Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of *Clostridium kluyveri*. FEBS Letters, 4, 108-112.

71. Thauer, R.K., Käufer, B., Zähringer, M., Jungermann, K. (1974): The reaction of iron-sulfur protein hydrogenase with carbon monoxide. Eur. J. Biochem. 42, 447-452.

72. Tsunoda, J.N., Yasunobu, K.T. (1968): Non-heme iron proteins. IX. The amino acid sequence of ferredoxin from *Micrococcus aerogenes*. J. Biol. Chem. 243, 6262-6272.

73. Twigg, R.S. (1945): Oxidation reduction aspects of resazurin. Nature, 155, 401-402.

74. Uyeda, K., Rabinowitz, J.C. (1971): Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. III. Purification and properties of the enzyme. J. Biol. Chem. 246, 3111-3119.

75. Velick, S.F., Furfine, C. (1963): Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase. In: The enzymes. Vol. 7, 243-273. Hrg.: Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K. Academic Press, New York.

76. Weimer, P.J., Zeikus, J.G. (1977): Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Appl. Environ. Microbiol. 33, 289-297.

77. Werner, W., Rey, H.G., Wielinger, H. (1970): Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode. Z. anal. Chem. 252, 224-228.

78. Westley, J.(1969): Enzymic catalysis. 44. Harper & Row, New York.

79. Wolfe, R.S., Higgins, I.J. (1979): Microbial biochemistry of methane- a study in contrasts. Int. Rev. Biochem., 21, 267-300. Hrg.: Quayle, J.R. Univ. Park Press, Baltimore.

80. Wolin, M.J. (1974): Metabolic interactions among intestinal microorganisms. Am. J. Clin. Nutr. 27, 1320-1328.

81. Yang, S.S., Ljungdahl, L.G., LeGall, J. (1977): A four-iron, four - sulfide ferredoxin with high thermostability from *Clostridium thermoaceticum*. J. Bacteriol. 130, 1084-1090.

82. Zehnder, A.J.B. (1978): Ecology of methane formation. In: Water pollution microbiology, Vol.2, 349-376. Hrg.: Mitchell, R. Wiley & Sons, New York.

83. Zeikus, J.G. (1977): The biology of methanogenic bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 514-541.

DANK

Herrn Prof. Dr. R.K. Thauer danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und besonders für die stete Hilfsbereitschaft und Förderung jeglicher Art.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bin ich wegen der angenehmen Zusammenarbeit sehr verpflichtet.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der an dieser Stelle ebenfalls gedankt sei.

LEBENSLAUF

Am 19. September 1947 wurde ich als Sohn des Mühlenbauers Josef Tewes und seiner Ehefrau Maria, geb. Grothues, in Nordborchen Kreis Paderborn geboren. Nach Besuch der ersten fünf Klassen der Volksschule besuchte ich von 1959 bis 1968 das altsprachliche Gymnasium Theodorianum in Paderborn.

Juni 1968	Reifeprüfung
WS 68/69	Beginn des Studiums der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig
Okt. 1970	Diplom-Biologen-Vorprüfung
Okt. 1974	Diplom-Biologen-Hauptprüfung mit Hauptfach Mikrobiologie
März 1975	Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Herrn Prof. R.K. Thauer an der Ruhr-Universität Bochum
Juli 1976	Beginn der vorliegenden Arbeit an der Philipps-Universität Marburg
seit Okt. 1976	Anstellung als Wissenschaftlicher Angestellter im Fachbereich Biologie-Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg